

Diagnostiek bij hemolytische anemie

Diagnostics in hemolytic anemia

dr. E.J. van Beers¹, prof. dr. S. Zeerleder², dr. V.M.J. Novotny³, dr. R. van Zwieten⁴, dr. B.J. Biemond²,
prof. dr. R.E.G. Schutgens¹ en dr. R. van Wijk⁵

SAMENVATTING

Recentelijk zijn de therapeutische mogelijkheden voor patiënten met zeldzame hemolytische anemie enorm toegenomen. Het belang van een juiste diagnose wordt dus steeds groter. In dit overzichtsartikel geven we met behulp van een stroomschema handvatten voor de diagnostiek naar de diverse oorzaken van hemolyse.

(NED TIJDSCHR HEMATOL 2017;14:64-74)

SUMMARY

Recently, the therapeutic options for patients with rare hemolytic anemia have increased tremendously. Therefore, the importance of correctly diagnosing rare hemolytic anemia has increased as well. In this review article we provide a flow-chart to aid the diagnosis of diverse causes of hemolytic anemia.

INLEIDING

Tot recent waren de therapeutische mogelijkheden voor de behandeling van de meeste vormen van hemolytische anemie beperkt. In de laatste jaren is echter het aantal geneesmiddelen voor de behandeling van diverse vormen van verworven en aangeboren hemolytische anemie sterk toegenomen. Ook voor relatief zeldzame vormen van hemolytische anemie zoals pyruvaatkinasedeficiëntie en koude antistof gemedieerde auto-immuun hemolytische anemie zijn nu veelbelovende specifieke therapieën in ontwikkeling. Met de toenemende belangstelling voor de langetermijneffecten van chronische anemie, zoals ijzerstapeling en orgaanschade, is het belang van de juiste diagnose, behandeling én langdurige follow-up van deze patiënten duidelijker geworden. Bij erfelijke vormen van hemolytische anemie is een juiste diagnose tevens van groot belang om de patiënt goede adviezen rondom de erfelijkheid van de ziekte te kunnen geven. In dit overzichtsartikel proberen we met behulp van

een stroomschema enkele handvatten te bieden voor diagnostiek naar de oorzaak van hemolyse.

TEKENEN VAN HEMOLYSE

De klassieke klinische verschijnselen van ernstige hemolyse, zoals anemie en icterus, zijn wel bekend en eenvoudig te herkennen. Milde hemolyse of mengbeelden zijn vaak moeilijker te herkennen. Hier bespreken we de effecten van hemolyse op de hemolytische parameters haptoglobine, reticulocyten, lactaatdehydrogenase en bilirubine.

Heem, het zuurstofbindende deel van het hemoglobine (Hb)-molecuul is uitermate toxisch. Daarom wordt Hb indien het vrijkomt tijdens hemolyse direct gebonden aan in het plasma circulerend haptoglobine. Dit gebeurt zowel bij intravasculaire hemolyse als bij extravasculaire hemolyse.¹ Derhalve is een verlaagd haptoglobine een van de gevoeligste parameters voor het aantonen van hemolyse. Alleen bij neonaten wordt een geïsoleerd

¹internist-hematoloog, Van Creveldkliniek, Universitair Medisch Centrum Utrecht, ²internist-hematoloog, afdeling Klinische Hematologie, Academisch Medisch Centrum en afdeling Immunopathologie, Sanquin Research, ³internist-hematoloog afdeling Interne Geneeskunde, Gelre Ziekenhuis, ⁴hoofd Laboratorium, Laboratorium voor Rode Bloedcel Diagnostiek, Sanquin, ⁵senior docent onderzoeker, Laboratorium Klinische Chemie en Haematologie, Universitair Medisch Centrum Utrecht. Correspondentie graag richten aan dhr. dr. E.J. van Beers, internist-hematoloog, Divisie Interne Geneeskunde en Dermatologie, Van Creveldkliniek, Universitair Medisch Centrum Utrecht, Huispostnummer C.01.412, Postbus 85500, 3508 GA Utrecht, tel.: 088 75 584 50, e-mailadres: e.j.vanbeers-3@umcutrecht.nl

Belangenconflict: geen gemeld. Financiële ondersteuning: geen gemeld.

Trefwoorden: diagnostiek, differentiaaldiagnose, hemolytische anemie, verworven hemolytische anemie, zeldzame anemie

Keywords: acquired hemolytic anemia, diagnostic work-up, differential diagnosis, hemolytic anemia, rare anemia

verlaagd haptoglobine zonder hemolyse frequent gezien. Zeldzame andere oorzaken van verlaagd haptoglobine zijn zeer ernstige levercirrose en congenitale haptoglobinemie.^{1,2}

Haptoglobine is een positief acutefase-eiwit en de productie is verhoogd bij inflammatie. In theorie zou dit effect een zeer milde hemolyse kunnen maskeren, maar in de praktijk is het acutefase-effect veel te mild om het verhoogde verbruik van haptoglobine in het geval van hemolyse te compenseren.¹

In het geval dat vrij Hb niet meer kan worden geneutraliseerd door haptoglobine wordt het geoxideerd met als gevolg dat heem vrijkomt. Vrij heem kan door het plasmaeiwit hemopexine worden geneutraliseerd. Net als het hemoglobine-haptoglobinecomplex wordt ook het heem-hemopexinecomplex via receptorgemedieerde opname door macrofagen in de lever verwijderd. In analogie met haptoglobuline is de capaciteit van hemopexine beperkt. In uitzonderlijke gevallen zou bij twijfel omtrent de aanwezigheid van hemolyse daarom nog een hemopexine-bepaling kunnen worden gedaan.

Heem wordt door heem-oxigenase-1 afgebroken tot koolstofmonoxide, vrij ijzer en biliverdine. Biliverdine wordt vervolgens snel omgezet in ongeconjugeerd bilirubine. Deze afbraakproducten kunnen dan ook vaak in verhoogde concentratie worden aangetroffen bij patiënten met hemolyse.

Een normaal Hb of een normaal reticulocytenaantal sluit hemolyse niet uit. Dit hangt vooral af van de snelheid van ontstaan van de hemolyse en de mogelijkheid van het beenmerg om te compenseren. Combinaties van hemolyse met omstandigheden die de hematopoëse remmen, zoals recente behandeling met cytotoxische geneesmiddelen, ijzergetekort of beenmerginvasie, geven uiteraard geen reticulocytose. In bepaalde gevallen van hereditaire hemolytische ziekte, zoals bij congenitale dyserythroëtische anemie, is een opvallend gebrek aan reticulocytenrespons juist een aanwijzing voor de diagnose.

Naast de eerdergenoemde afbraakproducten van heem komen er bij hemolyse enzymen vrij die zich in de rode bloedcel bevinden, zoals lactaatdehydrogenase (LDH) en aspartaataminotransaminase (ASAT). Beide enzymen komen echter ook in veel andere celtypen voor en zijn daarom niet specifiek voor hemolyse. De diagnostische waarde is derhalve beperkt, maar het kan nuttig zijn om deze waarden te vervolgen om een beeld te krijgen

van de respons op therapie.

Hemolyse kan aanvalsgewijs optreden, waarbij hemolyseparameters tussentijds geheel normaal kunnen zijn.

Samengevat kan worden gesteld dat er geen ultieme test is om hemolyse aan te tonen of uit te sluiten. Een normaal haptoglobine maakt ernstige hemolyse echter zeer onaannemelijk. In de praktijk zullen de klinische verschijnselen samen met de genoemde laboratoriumbepalingen snel uitsluitel kunnen geven bij een vermoeden van hemolyse.

OORZAKEN VAN HEMOLYSE

Hemolyse kan vele oorzaken hebben (zie *Tabel 1*), waarbij verschillende onderverdelingen kunnen worden gemaakt op basis van familieanamnese en de vraag of de primaire pathologie in de rode bloedcel zelf (intrinsiek) of elders is gelegen (extrinsiek). Deze indeling helpt bij het diagnosticeren van de oorzaak van hemolyse, aangezien er geen specifieke testen zijn om deze diverse groepen te onderscheiden. Daarnaast kan onderscheid worden gemaakt tussen verschillende vormen van hemolyse op basis van de plaats van afbraak (intra- versus extravasaal). Dit laatste is niet direct van belang voor de diagnostiek, maar geeft wel inzicht in de plaats waar hemolyse in het lichaam plaatsvindt en is mogelijk van belang voor de behandeling van immunologische oorzaken van hemolyse. Een samenvatting van het stappenplan is gegeven in *Figuur 1*, pagina 67, en wordt in de volgende paragrafen verder toegelicht. Op diverse websites wordt een alternatief voor dit stappenplan aangeboden. Zie bijvoorbeeld een recent initiatief op dit gebied van het European Network for Rare and Congenital Anemias, te vinden op www.anaemia-experts.org.

AANTONEN IMMUNOLOGISCHE OORZAAK

Als eerste stap in de diagnostiek van hemolyse stellen wij voor om antistof-gemedieerde oorzaken aan te tonen dan wel uit te sluiten. De directe antiglobinetest (DAT of de 'directe Coombs-test' genoemd) is een test waarbij antistoffen gebonden aan erythrocyten en/of complementdepositie worden aangetoond. Erythrocyten van de patiënt worden gewassen en geïncubeerd met polyspecifiek humaan antiglobine ('Coombs-reagens'). Indien er agglutinatie optreedt, is de DAT positief en indicatief voor in vivo gebonden antistoffen en/of complementdepositie op het oppervlak van de erythrocyt.³ Overigens leidt niet elke positieve DAT tot hemolyse. Wanneer de DAT echter positief is bij een patiënt met (verdenking op)

TABEL 1. Classificatie van hemolyse op basis van onderliggende oorzaak.

Intrinsiek	Extrinsiek
Hemoglobinopathie	Mechanisch
Membraanafwijkingen	Antistof-gemedieerd
Enzymdeficiënties	Micro-angiopathie
Niet-immunologisch	Immunologisch
Hemoglobinopathie	Antistof-gemedieerd
Membraanafwijkingen	Micro-angiopathie
Enzymdeficiënties	
Paroxysmaal nachtelijke hemoglobinurie	
Micro-angiopathie	
Hereditair	Verworven
Hemoglobinopathiën	Mechanisch
Membraanafwijkingen	Antistof-gemedieerd
Enzymdeficiënties	Micro-angiopathie
	Paroxysmaal nachtelijke hemoglobinurie

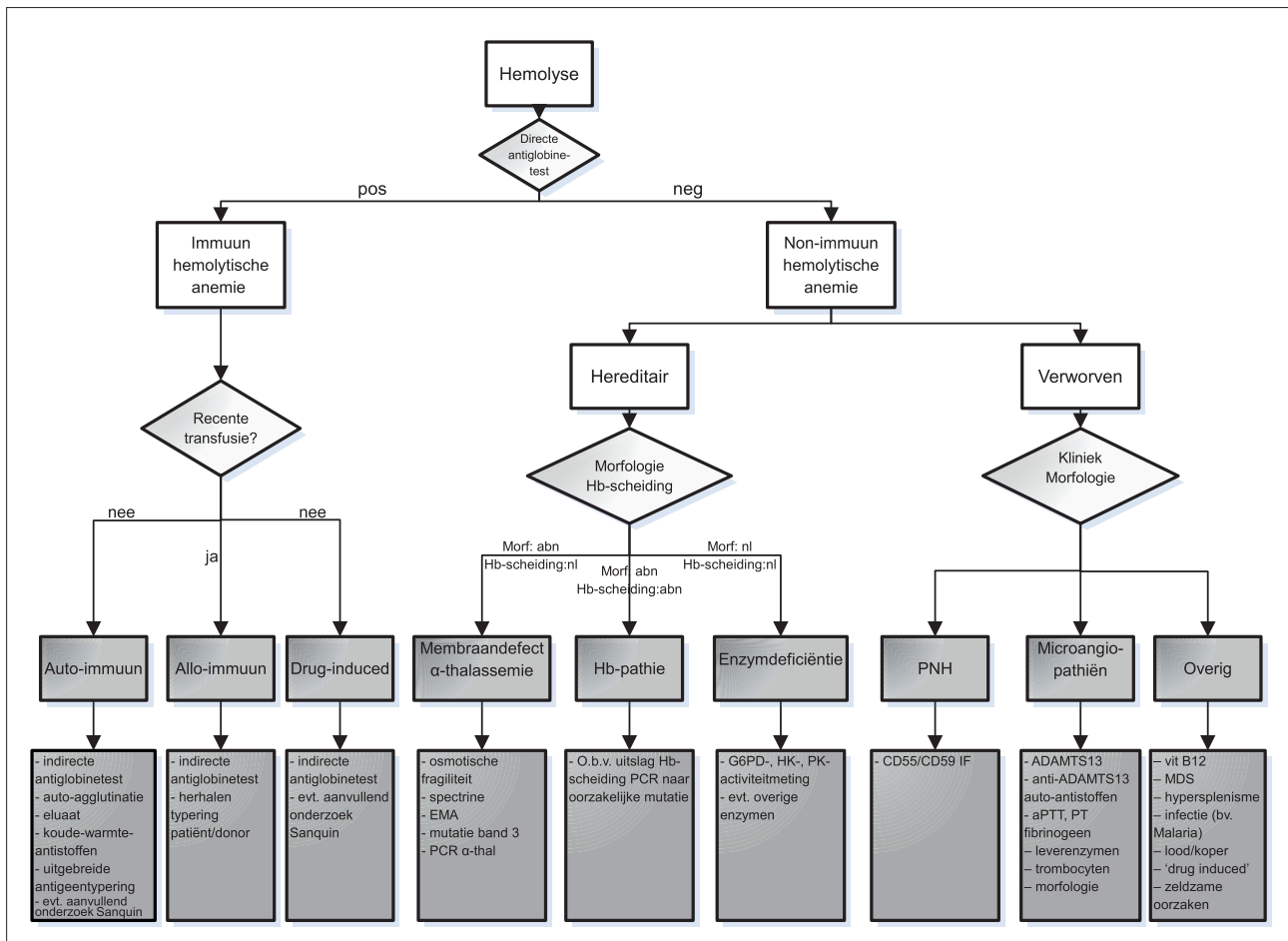
hemolyse, gaat het zeer waarschijnlijk om een hemolyse op basis van een immunologische oorzaak. Met behulp van het eluaat van de op de erythrocyten gebonden antistoffen en typering kan een onderscheid worden gemaakt tussen allo- en autoantistoffen. In de praktijk wordt vaak echter geen specificiteit van de aangetoonde antistoffen vastgesteld (aspecifieke antistoffen).

AUTO-IMMUUN HEMOLYTISCHE ANEMIE (AIHA)

Bij een AIHA is er sprake van een versnelde afbraak van erythrocyten veroorzaakt door autoantistoffen (auto-AS) gericht tegen erythrocyten met of zonder complement-activatie. De diagnostische kenmerken zijn hemolyse met een positieve DAT. In 50% van de gevallen gaat AIHA samen met een onderliggende ziekte, zoals lymfoproliferatieve aandoening, auto-immuunziekten of infectie (secundaire AIHA). In de andere helft van de gevallen kan geen oorzaak worden gevonden (primaire/idiopatische AIHA). Op basis van de optimale bindings-temperatuur van de auto-AS aan erythrocyten wordt onderscheid gemaakt tussen:

- warme auto-AS: frequentie 1:100.000, binding >30°C, meestal IgG (zeldzaam IgA);
- koude auto-AS: frequentie 1:1.000.000, binding <30°C, meestal IgM (ook passagère zoals bij Mycoplasma-infecties);
- bifasische auto-AS: zeer zeldzaam, binding <30°C, IgG (Donath-Landsteiner).

Het isotype van de auto-AS bepaalt het mechanisme van afbraak. Erythrocyten beladen met auto-AS van type IgG in afwezigheid van complementactivatie worden door macrofagen in de milt via Fc-receptoren afgebroken. Antistoffen van type IgM, maar ook IgG-antistoffen, kunnen tot complementactivatie leiden. Vaak leidt deze complementactivatie tot complementdepositie op de erythrocyten (C3b/C3d in de DAT).⁴ Erythrocyten beladen met C3b/d worden door kupffercellen in de lever via complementreceptoren afgebroken. In de meeste gevallen is er sprake van erythrocyten die beladen zijn met IgG en C3b/d. Deze erythrocyten worden dan in zowel de milt als de lever afgebroken (extravasale hemolyse).



FIGUUR 1. Diagnostisch stroomdiagram bij hemolyse. Een directe antiglobinetest (DAT) maakt onderscheid tussen immunologische en niet-immunologische oorzaken van hemolyse. Bij een positieve DAT zal de diagnostiek worden geleid door gegevens over eerdere bloedtransfusies of medicatiegebruik. Bij een niet-immunologische oorzaak dient een onderscheid te worden gemaakt tussen hereditaire of verworven vormen. Bij lang bestaande hemolyse zonder duidelijke andere klinische symptomen of bij een positieve familieanamnese dient aan een hereditaire hemolyse te worden gedacht. Indien dit onduidelijk is, zal de morfologie in combinatie met de kliniek snel richting geven voor de volgende stap. De klinische verschijnselen bij de patiënt zullen uitwijzen of er sprake is van een paroxysmale nachtelijke hemoglobinurie (PNH), trombotische trombocytopenische purpura (TTP), diffuse intravasale coagulatie (DIC) of een HELLP-syndroom, waarna gerichte diagnostiek kan plaatsvinden. Het onderscheid tussen membraan-, enzym- of hemoglobineafwijkingen kan worden gemaakt door gebruik te maken van cytomorfologie, osmotische fragiliteit en een Hb-scheiding, gevolgd door gerichte diagnostiek.

Alhoewel ook auto-AS met isotype IgG3 en IgG1 complement kunnen activeren, blijkt in de praktijk de complementdepositie (C3b/C3d) op erythrocyten meestal het gevolg van een ('hidden') IgM dat niet kan worden aangetoond. In zeldzame gevallen leiden de auto-AS (meestal IgM) tot een volledige complementactivatie met intravasale hemolyse als gevolg. In enkele gevallen is er ook een fulminante intravasale hemolyse beschreven door autoantistoffen type IgA. IgM koude antistoffen kunnen bij lage temperaturen in de perifere bloedvaten agglutineren (agglutinatie) en leiden tot stase in de perifere vaten (acrocyanose). Afhankelijk van de tempe-

ratuuramplitude kunnen deze antistoffen ook leiden tot complementactivatie (positieve directe Coombs-test voor C3b/C3d).

Bij laboratoriumonderzoek zoals boven vermeld is de DAT bij AIHA meestal positief met polyspecifiek antiglobulinereagens (anti-IgG en anti-complement). Een negatieve DAT sluit een immuunemedieerde hemolyse echter niet voor 100% uit (cave hemolysinen). Bij een positieve DAT volgt aanvullend een DAT met monospecifieke anti-IgG/anti-IgM/anti-IgA/anti-complement-antistoffen, een indirecte antiglobinetest en een aan-

vullend eluaat van patiëntenerytrocyten.³ Omdat de erythrocyten beladen zijn met autoantistoffen is de anti-geen-typing, maar ook de screening voor alloantistoffen moeilijk, omdat het serum van de patiënt in ieder geval zal reageren met de erythrocyten van het screeningspaneel. De procedures om ondanks de specifieke reacties een bloedgroeytyping te verrichten en allo-antistoffen te identificeren zijn tijdrovend. Vaak worden de patiëntensera voor uitgebreid immuunhematologisch onderzoek naar Sanquin gestuurd (Landelijk referentielaboratorium onder leiding van prof. M. de Haas).

ALLO-IMMUUN HEMOLYTISCHE ANEMIE

De kliniek bestaat uit een directe (acute) of uitgestelde hemolytische transfusi-reactie. Een hemolyse op basis van een uitgestelde transfusi-reactie kan 3-10 dagen, maar soms langer na transfusie optreden (cave: anti-Kidd-antistoffen kunnen vanwege lage titers in de screening worden gemist en kunnen worden 'geboost' na transfusie). Bij laboratoriumonderzoek worden specifieke allo-antistoffen tegen erythrocytenantigenen gevonden die bij de ontvanger ontbreken. Patiënten die al allo-antistoffen hebben gevormd, hebben een verhoogd risico nieuwe allo-antistoffen te vormen. Daarom wordt aanbevolen bij patiënten met al bestaande irreguliere antistoffen bij een volgende transfusie een product te kiezen dat minimaal volledig Rh- en Kell-compatibel is en negatief is voor het antigeen waartegen de allo-antistoffen gericht zijn (*CBO-richtlijn Bloedtransfusie 2011*).

MEDICAMENT-GEÏNDUCEERDE HEMOLYSE

Diverse antistoffen kunnen medicament-geïnduceerde hemolyse veroorzaken. Dit kan door specifieke beschadiging van de erythrocyt of door een antistof-gemedieerd mechanisme. Verschillende immunologische mechanismen kunnen hiervoor verantwoordelijk zijn. Een actuele lijst van geneesmiddelen valt elders te raadplegen (bijvoorbeeld UptoDate®). Meestal betreft het bèta-lactam-antibiotica en minder frequent fluorochinolonen of NSAID's. Een medicament-geïnduceerde hemolytische anemie met een immunologische oorzaak is beschreven voor een groot aantal geneesmiddelen. Ook metabolieten van sommige geneesmiddelen kunnen een versnelde celafbraak induceren. Denk bij verergering of ontstaan van hemolyse na geneesmiddelengebruik ook aan glucose-6-fosfaatdehydrogenase (G6PD)-deficiëntie.

Verschillende mechanismen van celafbraak

Vorming van autoantistoffen ten gevolge van het geneesmiddel
Het geneesmiddel kan tot specifieke veranderingen van

de erythrocytenantigenen leiden. Er kan een immuunrespons ontstaan tegen het veranderde antigeen (neo-epitooop) waartegen autoantistoffen worden gevormd die voor hun reactiviteit met de erythrocyt zelf onafhankelijk zijn van de aanwezigheid van het geneesmiddel. Dit wordt vooral gezien bij gebruik van alfa-methyldopa. In een dergelijk geval is het serologisch beeld identiek aan dat van de auto-immuun hemolytische anemie ten gevolge van IgG-warmte-autoantistoffen. De autoantistoffen zijn bijna altijd van de IgG1-subklasse. Na het staken van alfa-methyldopa (Aldomet®) kunnen autoantistoffen nog maanden aantoonbaar zijn.

Geneesmiddeladsorptiemechanisme

Bij dit afbraakmechanisme van rode bloedcellen zijn de antistoffen gericht tegen een geneesmiddel dat zich sterk bindt aan het celoppervlak. Afhankelijk van de hoeveelheid gebonden geneesmiddel en dus van de hoeveelheid antistof, treedt hemolyse op. Deze afbraak is dosisafhankelijk. Vaak zijn het geneesmiddel en de antistof in vitro niet van de erythrocyten te verwijderen door te wassen en vindt men een positieve DAT met anti-IgG en soms ook met anti-complement. Het hier beschreven serologisch beeld ziet men typisch bij hoge doses penicilline. Na het staken van het geneesmiddel wordt de DAT snel negatief.

Immuuncomplexmechanisme

Bij dit proces van afbraak van rode bloedcellen zijn geneesmiddel, rode bloedcellen en antistoffen alle drie betrokken bij een immunologische reactie. Het is nog niet geheel duidelijk of in dit geval het geneesmiddel zich eerst aan een membraan van de erythrocyt hecht en de antistof zich richt tegen het geneesmiddel-antigeen-complex en hieraan bindt, of dat de binding van geneesmiddel en antistof al in het plasma plaatsvindt, gevolgd door binding van het complex aan de erythrocyt. In beide gevallen is het effect dat de antistoffen zich ophopen op de celmembraan en dat complement wordt gebonden en geactiveerd, hetgeen leidt tot hemolyse. Na het staken van het geneesmiddel vermindert de afbraak snel.

Deze vorm van medicament-geïnduceerde hemolyse moet als mogelijkheid worden overwogen indien na gebruik van een geneesmiddel een plotselinge en sterke afbraak van cellen optreedt, die na het staken van het gebruik snel vermindert. Ook kunnen afbraakproducten van een geneesmiddel in plaats van het intacte geneesmiddel betrokken zijn bij het ontstaan van dergelijke antistoffen. Een voorbeeld van een geneesmiddel dat

hemolyse volgens dit mechanisme veroorzaakt is kinidine. Kinidine kan zowel hemolytische anemie als trombocytopenie veroorzaken ('cocktailtrombopenie').

Diagnostiek van antistoffen tegen bloedcellen bij geneesmiddelengebruik

In het immuunhematologisch referentielaboratorium van Sanquin Diagnostiek kan worden onderzocht of antistoffen verantwoordelijk zijn voor de hemolyse bij geneesmiddelengebruik. De cellen van de patiënt worden na behandeling met het geneesmiddel getest met serologische technieken. In de acute fase kan de concentratie van antistoffen in het patiëntenserum soms te laag zijn om deze te kunnen aantonen. In een serummonster, afgenomen 10 dagen na het staken van het geneesmiddel, zijn de antistoffen dan soms wel aantoonbaar.

NIET-IMMUNOLOGISCHE VORMEN VAN HEMOLYSE

Als antistof-gemedieerde hemolyse is uitgesloten, dan ligt een niet-immunologische oorzaak van hemolyse voor de hand. Onze aanpak is dan vervolgens om een klinisch oordeel te geven over de waarschijnlijkheid van een erfelijke (erfelijke) of een verworven vorm. Het onderscheid kan worden gemaakt door te kijken naar de leeftijd waarop de eerste symptomen zich voordoen, naar een familiair voorkomen en naar andere klinische tekenen zoals trombocytopenie, hepato-splenomegalie, skeletdeformaties en/of groeiachterstand. Indien onduidelijkheid bestaat over de erfelijkheid van de ziekte adviseren wij op basis van rodebloedcelmorfologie en kliniek verder het stappenplan te vervolgen.

HEREDITAIRE NIET-IMMUNOLOGISCHE HEMOLYSE

De meest voorkomende hereditaire vormen van hemolyse kunnen worden verdeeld in drie groepen: membraan-defecten, hemoglobinopathieën (waaronder sikkelcelziekte en thalassemieën) en enzymdeficiënties. De basis voor de diagnostiek bestaat uit cytomorfologisch onderzoek van de rode bloedcellen in combinatie met een hemoglobinescheiding (elektroforese of HPLC) en bepaling van de osmotische fragiliteit van de rode bloedcel (zoals de osmotische resistentietest of zureglyceroltest (AGLT), veelal in combinatie met de EMA-test (zie onder)).

Cytomorfologische afwijkingen zijn vooral aanwezig bij membraan-defecten (zoals elliptocyten, sferocyten, poikilocyten, stomatocyten). Ook bij hemoglobinopathieën komen morfologische afwijkingen voor (bijvoor-

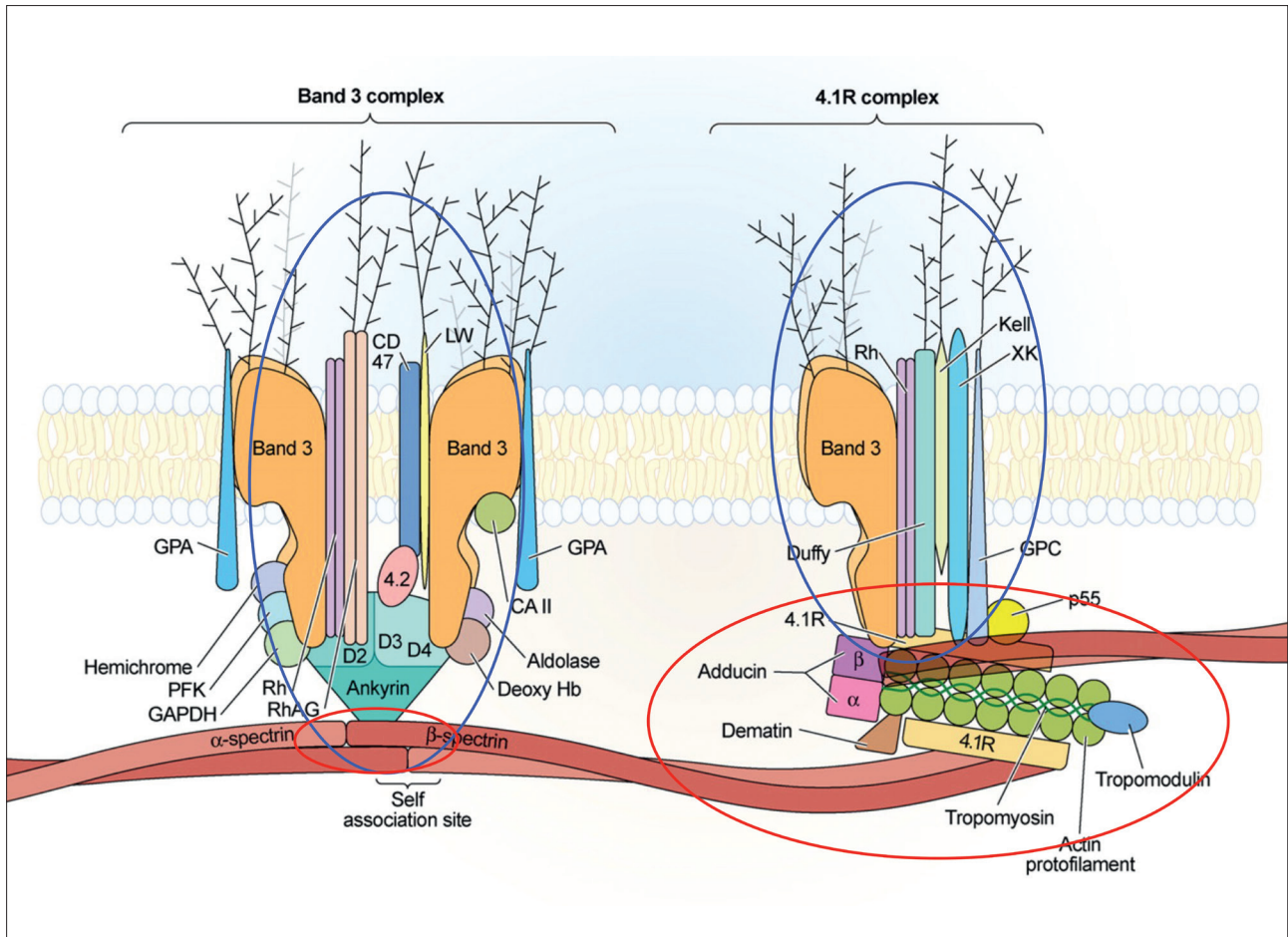
beeld sikkelcellen en schietschijfcellen ('target cells')). Enzymdeficiënties geven in het algemeen geen specifieke morfologische afwijkingen. Een toegenomen osmotische fragiliteit wordt vaak gezien als gevolg van membraan-defecten, maar niet bij hemoglobinopathieën en enzymdeficiënties. Thalassemieën presenteren zich vaak met een verhoogde osmotische resistentie van de rode bloedcellen.

Buiten bovengenoemde oorzaken is er nog een aantal zeer zeldzame vormen van hereditaire hemolytische anemie. Met name een congenitale dyserythropoëtische anemie type 2 toont veel overeenkomsten met hereditaire sferocytose, maar kenmerkt zich door een relatief laag aantal reticulocyten voor de mate van anemie.

Membraan-defecten

Morfologisch zijn hereditaire membraan-defecten te onderscheiden in elliptocytose, sferocytose, pyropoikilocytose, 'South-east Asian Ovalocytose' (SAO) en stomatocytose/xerocytose. In geval van cytomorfologische afwijkingen en een toegenomen osmotische fragiliteit is de verdenking op een membraan-defect hoog. Een uitzondering hierop vormt SAO: deze vertonen een kenmerkende morfologie met ovalocyten, maar zijn meer rigide en vertonen een verminderde osmotische fragiliteit.

Een membraan-defect kan optreden wanneer er een verstoring optreedt in de architectuur van het cytoskelet van de erythrocyt (horizontale interacties) en de wijze waarop dit cytoskelet het plasmamembraan verankert (verticale interacties) (zie *Figuur 2*). Afwijkingen in horizontale interacties hebben effect op het spectrine-actine-proteïne 4.1-complex en op de associatie van spectrinemoleculen onderling, die cruciaal zijn voor de membraanelasticiteit. Klassieke voorbeelden hiervan zijn hereditaire elliptocytose (HE) en hereditaire pyropoikilocytose (HP). HE (prevalentie 1-4:4.000) wordt bij 95% veroorzaakt door defecten in spectrine en bij 5% door proteïne 4.1-deficiëntie en erft over het algemeen dominant over. HP is een zeldzame ernstige vorm van HE, meestal veroorzaakt door 'compound' heterozygote mutaties in spectrine en erft recessief over. Hereditaire sferocytose (HS) (prevalentie 1:4.000) is het meest voorkomende membraan-defect en wordt veroorzaakt door afwijkingen in eiwitten die de membraan aan het cytoskelet verbinden (verticale interacties), met name ankyrine, band 3 en eiwit 4.2.⁵ Bij het zien van bolvormige hyperchrome cellen en een toegenomen osmotische fragiliteit is de verdenking op sferocytose hoog. Bij een goede miltfunctie zijn de morfologische afwijkingen echter niet altijd opvallend. In 75% van de



FIGUUR 2. Membraanskelet van de erythrocyt.⁵ Een membraandefect kan optreden wanneer er een verstoring optreedt in de architectuur van het cytoskelet van de erythrocyt (horizontale interacties, rode cirkels) en de wijze waarop dit cytoskelet is verankerd aan de plasmamembraan (verticale interacties, blauwe cirkels). Tot de afwijkingen in horizontale interacties behoren defecten van spectrine zelfassociatie en in het spectrine-actine-proteïne 4.1-complex, beide van belang voor de membraanelasticiteit. Defecten in spectrine (95%) en proteïne 4.1 (5%) leiden tot hereditaire eliptocytose. Afwijkingen in de eiwitten ankyrine, band 3, spectrine en eiwit 4.2, alle betrokken in de verticale interacties, leiden tot hereditaire sferocytose (HS). Merk op dat veel eiwitten van het band 3-complex, zoals de rhesus-eiwitten, Kell en Duffy, een belangrijke rol spelen als antigeen in de bloedtransfusiegeneeskunde. 4.1R=eiwit 4.1, 4.2=eiwit 4.2, Rh=rhesus, GPA=glycophorine A, GPC=glycophorine C, LW=Landsteiner-Wiener-glycoproteïne.

gevallen is HS een dominant overervende aandoening, echter in 25% van de gevallen is de overerving recessief. SAO is een subklinisch verlopende afwijking aan de rodebloedcelmembraan die wordt veroorzaakt door dezelfde mutatie in band 3. De kenmerkende ovalocyten zijn meer rigide en vertonen derhalve een verlaagde osmotische fragiliteit. SAO erft dominant over en komt frequent voor in malaria-endemische gebieden (5-25%). Hereditaire stomatocytose (prevalentie 1:50.000) is een groep zeldzame tot zeer zeldzame dominant overervende aandoeningen die wordt veroorzaakt door een abnormale membraanpermeabiliteit voor cationen. Stomatocytose heeft een typisch beeld bij cytomorfologie.

Bij deze aandoeningen is de incidentie van trombotische complicaties na splenectomie verhoogd. Een correcte diagnose is derhalve van belang indien splenectomie wordt overwogen.

Door middel van cytomorfologie kan soms al een diagnose worden gesteld. De gouden standaard voor het vaststellen van membraanstoornissen is echter osmotische gradiëntektactometrie. Deze techniek wordt uitgevoerd op de Lorca ('Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer') en betreft het meten van de mate van vervormbaarheid van de rode bloedcel als functie van graduele veranderingen in de extracellulaire osmotische omstandigheden. Het aldus verkregen patroon is karak-

teristiek voor het type membraanstoornis. Deze techniek is in Nederland in meerdere expertisecentra beschikbaar (UMC Utrecht, R. van Wijk, Sanquin, R. van Zwieten). Aanvullend kan het spectrinegehalte worden bepaald en de eosine-5-maleimide (EMA)-test worden gedaan (Sanquin, R. van Zwieten, UMC Utrecht, R. van Wijk). Beide testen zijn zeer specifiek en met name de laatste ook heel gevoelig voor HS. Verlaagd spectrine en/of verlies aan EMA-kleuring kan zowel een primair gevolg zijn van een defect in spectrine of band 3 (de belangrijkste epitop voor EMA-binding) of secundair zijn aan andere defecten van de erythrocytaire membraan. Moleculair onderzoek naar de precieze mutatie is nu mogelijk voor de negen belangrijkste genen betrokken bij membraanstoornissen of ziektebeelden die daarop kunnen lijken, te weten α -spectrine (*SPTA1*), β -spectrine (*SPTB*), ankyrine (*ANK1*), band 3 (*SLC4A1*), eiwit 4.1 (*EPB41*), eiwit 4.2 (*EPB42*), Rhesus-geassocieerd glycoproteïne (*RHAG*), 'Piezo type mechanosensitive ion channel component 1' (*PIEZO1*, xerocytose/gedehydrateerde stomatocytose) en SEC23 homolog B (*SEC23B*, *CDAIL*) (UMC Utrecht, R. van Wijk, Sanquin, R. van Zwieten). DNA-diagnostiek is met name relevant ter bevestiging van autosomaal recessieve vormen van HS, atypische presentatie van membraanstoornissen en uiteraard genetische en prenatale counseling. Daarnaast kan het behulpzaam zijn bij het stellen van de diagnose bij transfusie-afhankelijke patiënten bij wie reguliere (biochemische) diagnostiek niet mogelijk is.

Hemoglobinopathiën

Een Hb-scheiding en kwantificering van HbA₂ via 'High-Performance Liquid Chromatography' (HPLC) of via capillaire elektroforese volstaat bij verdenking op een hemoglobinopathie. Veelal kan het afwijkende hemoglobine worden herkend op basis van scheidingspatroon en een thalassemie worden gediagnosticeerd op basis van het percentage HbA₂. Bij een verhoogd HbA₂ kan de diagnose β -thalassemie worden overwogen. In geval van een normaal of verlaagd percentage HbA₂ en verdenking op thalassemie (laag MCV, relatief verhoogd aantal erythrocyten) is moleculair onderzoek naar een deletie van één of meer α -globinegenen geïndiceerd. Bovendien kunnen de regio's waarin deze genen liggen worden gescreend voor grote deleties met behulp van de MLPA-techniek (UMC Utrecht, A. Huisman/Sanquin, R. van Zwieten/LUMC, C. Hartevelt). Zo nodig kunnen zowel de α -globinegenen als de β -globinegenen worden gesequenced om afwijkende hemoglobines en thalassemieën te benoemen (UMC Utrecht, A. Huisman/LUMC,

C. Hartevelt/Sanquin, R. van Zwieten).⁷ Aanbevolen wordt om een diagnose gesteld op een HPLC-uitslag met een andere techniek te bevestigen, bij voorkeur op DNA-niveau.⁸

Enzymdeficiënties

Als er sprake is van een hemolytische anemie zonder duidelijke en/of specifiek afwijkende rodebloedcelmorfologie, een normale osmotische fragiliteit en geen aanwijzingen voor een hemoglobinoopathie, dan is er een verdenking op een erythrocytaire enzymstoornis (zoals deficiënties). Enzymdeficiënties leiden tot een gebrek aan metabole energie en/of reducerend vermogen van de rode bloedcel (zie *Tabel 2*). Alleen als de cellen niet (langer) in staat zijn om in hun metabole behoefte te voorzien, leidt dit tot een verkorte levensduur van de rode bloedcel, met vroegtijdige verwijdering door de milt.⁹ Dit uit zich over het algemeen in een vorm van, respectievelijk, chronische hemolyse (kenmerkend voor stoornissen van de glycolyse en het nucleotide-metabolisme) of acute hemolyse (kenmerkend voor stoornissen van de hexosemonofosfaatshunt en het glutathionmetabolisme). Vaak gaat het om enzymen die ook in andere weefsels tot expressie komen, maar juist de langlevende en kernloze rode bloedcel is niet in staat voor deze deficiëntie te compenseren door het ontbreken aan biosynthesecapaciteit. Bij een deel van de enzymdeficiënties is de stoornis echter wel geassocieerd met klinische verschijnselen anders dan hemolyse en anemie, in het bijzonder neuromusculaire symptomen of myopathie.

De overerving van enzymstoornissen is meestal autosomaal recessief, maar autosomaal dominant voor adenosinedeaminase (ADA)-hyperactiviteit en X-chromosoom gebonden voor G6PD en fosfoglyceraatkinasedeficiëntie.¹⁰ De meest voorkomende stoornissen zijn deficiënties van glucose-6-fosfaatdehydrogenase (G6PD) (prevalentie 1 tot 5%) en pyruvaatkinase (PK) (prevalentie 1:20.000-1:300.000). De activiteit van deze beide enzymen wordt daarom als eerste bepaald. Omdat jonge rode bloedcellen een hoge enzymactiviteit hebben, kan een deficiëntie worden gemaskeerd door een reticulocytose. Daarom wordt de gemeten activiteit altijd gerelateerd aan de activiteit van een ander leeftijdsafhankelijk enzym, bijvoorbeeld hexokinase (HK). Deficiënties van G6PD en enzymen van het glutathionmetabolisme gaan in het algemeen vaker gepaard met periodieke hemolyse (bijvoorbeeld na infectie, bepaalde medicatie of het eten van tuinbonen). Zie voor een lijst van geneesmiddelen

TABEL 2. Erythrocytaire enzymdefecten geassocieerd met hemolyse.

Enzymdeficiënties van glycolyse en nucleotide metabolisme	Enzymdeficiënties van hexosemonofosfaatshunt en glutathionmetabolisme
Hexokinase ^{1,2}	Glucose-6-fosfaatdehydrogenase ^{1,2,3}
Glucosefosfaatisomerase ^{1,2}	Glutamaatcysteïneligase ²
Fosfofructokinase ^{1,2}	Glutathionsynthetase ²
Aldolase ^{1,2}	Glutathionreductase ^{1,2,3}
Triosefosfaatisomerase ^{1,2}	
Fosfoglyceraatkinase ^{1,2}	
Pyruvaatkinase ^{1,2,3}	
Adenosinedeaminase* ¹	
Pyrimidine-5'-nucleotidase ^{1,2}	
Adenylaatkinaze ^{1,2}	

1: Biochemische test beschikbaar in het UMC Utrecht.
 2: Genetische test beschikbaar in het UMC Utrecht en Sanquin Amsterdam.
 3: Biochemische test beschikbaar in Sanquin Amsterdam.
 * Hyperactiviteit

die hemolyse kunnen veroorzaken bij G6PD het handboek *Commentaren Medicatiebewaking*, versie 2015-2016, hoofdstuk G6PD. Bij PK-deficiëntie en andere stoornissen van de glycolyse of het nucleotidenmetabolisme is de hemolyse vaak chronisch aanwezig. In geval van sterke verdenking op een enzymdefect met normale activiteit van G6PD en PK, kan aanvullend biochemisch enzymonderzoek worden gedaan naar 12 overige enzymdeficiënties (UMC Utrecht, R. van Wijk). Een enzymdeficiëntie dient bij voorkeur op DNA-niveau te worden bevestigd (UMC Utrecht, R. van Wijk). Soms is het handiger om bij een vermoeden van een zeldzame enzymdeficiëntie direct te zoeken naar mutaties in een groot aantal genen die voor deze enzymen coderen, en in tweede instantie een defect te bevestigen met biochemisch onderzoek (Sanquin, R. van Zwieten/UMC Utrecht, R. van Wijk).

Erythroëtische stoornissen

Er zijn zeer veel verschillende stoornissen van de erythroëtische beschreven. Voorbeelden hiervan zijn de

erythroëtische porfyrieën, sideroblastische anemieën en de diverse vormen van congenitale dyserythroëtische anemie.¹¹⁻¹³ Bij deze ziekten staat een aanmaakstoornis op de voorgrond met een kenmerkend laag aantal reticulocyten. Aanmaakstoornissen kunnen soms gepaard gaan met milde hemolyse en horen dus thuis in de differentiaaldiagnose bij hemolyse. Een beenmergonderzoek met ijzerkleuring kan zeer behulpzaam zijn bij het stellen van de diagnose. In een toenemend aantal gevallen kan een diagnose worden bevestigd door DNA-onderzoek (Sanquin, M. van Lindern). Omdat een aanmaakstoornis hier meer op de voorgrond staat, zijn ze niet opgenomen in het stroomschema.

VERWORVEN NIET-IMMUNOLOGISCHE HEMOLYSE

Twee relatief veel voorkomende groepen verworven niet-immunologische hemolyse zijn paroxysmale nachtelijke hemoglobulinurie (PNH) en microangiopatische hemolyse.^{14,15} De kliniek van deze ziektebeelden verschilt dusdanig van elkaar dat het klinisch onderscheid niet

ingewikkeld is. Vaak ontstaat verworven niet-immunologische hemolyse secundair aan een andere ziekte. Voorbeelden hiervan zijn ernstige vitamine-B12-deficiëntie, myelodysplastisch syndroom, malaria, koper- of loodintoxicatie, bepaalde insecten- of slangenbeten en hypersplenisme. Bovenstaande klinisch vaak evidente oorzaken zullen meestal goed te herkennen zijn en worden hier ook niet besproken.

Paroxysmale nachtelijke hemoglobinurie (PNH)

PNH betreft een klonaal ziektebeeld dat wordt gekenmerkt door een chronische complement-gemedieerde intra- en extravasculaire hemolyse, die 's nachts, tijdens infecties of zonder duidelijke reden tijdelijk kan verergeren. De oorzaak is een mutatie in het *PIG-A*-gen in een deel van de cellen, leidend tot het ontbreken van, of een verlaagde expressie van glycosylfosfatidylinositol (GPI)-verankerde eiwitten. Het ontbreken van het GPI-anker leidt tot het ontbreken of tot een verlaagde expressie van complementregulatoren (CD55 en CD59), waardoor cellen vatbaarder worden voor complement-gemedieerde afbraak. Vaak is er sprake van een zekere mate van beenmergfalen en kan de ziekte aplastische anemie naast de PNH bestaan. Er is sprake van een sterk verhoogd risico op trombose (veneus en arterieel).¹⁶ De diagnose wordt bevestigd op een perifere bloedmonster door middel van immuunfenotypering waarbij in een FLAER ((fluorescent aerolysin) negatieve celpopulatie GPI-gebonden eiwitten zoals CD55 en CD59 op granulocyten ontbreken (type 3-cellen) of sterk afwezig zijn (type 2-cellen). Het aantal cellen met PNH-kenmerken kan/zal in de tijd toenemen met een verhoogd risico op klachten.

Microangiopathische hemolyse

Kenmerkend voor microangiopathische hemolyse is een combinatie van trombocytopenie, een negatieve DAT en een toename van het aantal fragmentocyten bij cytomorfologisch onderzoek van een perifere bloeduitstrijkje. De belangrijke voorbeelden van microangiopathische hemolyse worden in de volgende paragrafen besproken.

Trombotische trombocytopenische purpura (TTP)/hemolytisch uremisch syndroom (HUS)

Het klinische beeld is variabel, maar gaat vaak samen met koorts, neurologische afwijkingen, ischemische hartcomplicaties, nierinsufficiëntie en pancreatitis. Bij TTP worden vaker neurologische afwijkingen gezien en bij de verschillende vormen van HUS staat nierinsufficiëntie op de voorgrond. Zonder behandeling loopt

acute TTP in 90% van de gevallen dodelijk af. Diagnostiek en behandeling moet derhalve met spoed worden ingezet. Een ADAMTS13-activiteit <10% is diagnostisch voor TTP. Bij ADAMTS13-activiteit >10% is TTP minder waarschijnlijk en moet aan andere oorzaken van een microangiopathische hemolyse worden gedacht. Voor een compleet overzicht verwijzen we naar de NVVH/NfN-richtlijn voor behandeling met trombotische microangiopathie. Een aanvullende ADAMTS13-antistofbepaling helpt om een verworven deficiëntie van een hereditaire deficiëntie te onderscheiden. Bij verdenking op een hereditaire TTP wordt DNA-diagnostiek aanbevolen (prof. J. Voorberg, Sanquin). Bij presentatie met nierinsufficiëntie moet aan een verworven of aangeboren HUS worden gedacht. Dan is er sprake van een verworven of aangeboren afwijking van de complementregulatie van de alternatieve route van het complementsysteem. Genetische diagnostiek (CfH, CfB, Cfi, MCP, CfHR en trombomoduline) kan hier tot de uiteindelijke diagnose leiden (Sanquin, K. Gelderman).

Overige microangiopathische hemolyse

Indien er een niet-immunologische, verworven hemolyse aanwezig is met toegenomen aantal fragmentocyten zonder aanwijzing voor TTP/HUS, dient te worden gekeken naar ziektebeelden als diffuse intravasale coagulatie, HELLP-syndroom, catastrofaal anti-fosfolipiden-syndroom, hiv, gemetastaseerde maligniteit en maligne hypertensie.¹⁵ De kliniek is hierin leidend; vaak zullen deze ziektebeelden zich vroeg in het diagnostisch proces openbaren, voordat het stroomschema naar hereditaire hemolyse in gang wordt gezet. Niet-microangiopathische oorzaken van een toename van het aantal fragmentocyten is klephemolyse veroorzaakt door paravavulaire lekkage bij mechanische kunstkleppen, extra corporele circulatie en marshemoglobinurie. Over het algemeen zijn deze vormen van hemolyse mild van karakter en gaan niet gepaard met trombopenie.

TOEKOMST

Het recentelijk gepubliceerde consensusdocument 'The European Hematology Association Roadmap for European Hematology Research' licht een tip van de sluier op, waar toekomstig onderzoek en diagnostiek binnen de hematologie zich in Europa op zal richten.¹⁷ Anemie is hierin een belangrijk speerpunt, niet alleen omdat het wereldwijd 1,6 miljard mensen treft, maar ook om de diversiteit van de oorzaken.¹⁸ In West-Europa bijvoorbeeld is het niet ijzerebreksanemie, maar zijn het vooral de zeldzame erfelijke vormen van hemolytische

AANWIJZINGEN VOOR DE PRAKTIJK

- 1 Denk bij anemie ook aan hemolyse, dit is vaak eenvoudig aan te tonen of uit te sluiten met een combinatie van reticulocyten en een haptoglobinebepaling.**
- 2 In het geval van hemolyse zijn met een paar algemene testen en een goede anamnese de meeste oorzaken van hemolyse aan te tonen of uit te sluiten (zie stroomschema).**
- 3 In de zeldzame gevallen dat het hier gepresenteerde schema geen uitkomst biedt, kan laagdrempelig met de diverse expertisecentra worden overlegd.**

anemie die de meeste ziektejaren geleefd met anemie veroorzaken.¹⁹ Derhalve richten drie van de vijf speerpunten binnen het onderwerp anemie zich op: a) het ontwikkelen van nieuwe stappenplannen voor de diagnostiek naar (hemolytische) anemie, b) de epidemiologie van anemie in Europa en c) het ontwikkelen van gepersonaliseerde diagnostische mogelijkheden. Hierbij is de verwachting dat 'Next Generation Sequencing' (NGS)-oplossingen in de vorm van genpanels of 'Whole Exome Sequencing' (WES) een belangrijke rol gaan spelen.¹⁷ Conventionele technieken zullen dan gericht worden ingezet om de moleculaire diagnose te bevestigen in plaats van andersom. Voorlopig blijft de combinatie van anamnese, lichamelijk onderzoek en microscopie aangevuld door gerichte diagnostiek zoals voorgesteld in het stappenplan echter sneller en kosteneffectiever.

REFERENTIES

1. Körmöczy GF, et al. Influence of clinical factors on the haemolysis marker haptoglobin. *Eur J Clin Invest* 2006;36:202-9.
2. Azevêdo ES, et al. Ahaptoglobinaemia and predisposition to iron-deficiency anaemia. *J Med Genet* 1971;8:140-2.
3. Zeerleder S. Autoimmune haemolytic anaemia - a practical guide to cope with a diagnostic and therapeutic challenge. *Neth J Med* 2011;69:177-84.
4. Meulenbroek EM, et al. Complement deposition in autoimmune hemolytic anemia is a footprint for difficult-to-detect IgM autoantibodies. *Haematologica* 2015;100:1407-14.
5. Salomao M, et al. Protein 4.1R-dependent multiprotein complex: new insights into the structural organization of the red blood cell membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:8026-31.
6. Van Zwieten R, et al. Hereditary spherocytosis due to band 3 deficiency: 15 novel mutations in SLC4A1. *Am J Hematol* 2013;88:159-60.
7. Traeger-Synodinos J, et al. Advances in technologies for screening and diagnosis of hemoglobinopathies. *Biomark Med* 2014;8:119-31.
8. Van Zwieten R, et al. Hemoglobin analyses in the Netherlands reveal more than 80 different variants including six novel ones. *Hemoglobin* 2014;38:1-7.
9. Van Wijk R, et al. The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. *Blood* 2005;106:4034-42.
10. Koralkova P, et al. Rare hereditary red blood cell enzymopathies associated with hemolytic anemia - pathophysiology, clinical aspects, and laboratory diagnosis. *Int J Lab Hematol* 2014;36:388-97.
11. Donker AE, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of microcytic anemias due to genetic disorders of iron metabolism or heme synthesis. *Blood* 2014;123:3873-86; quiz 4005.
12. Iolascon A, et al. Congenital dyserythropoietic anemias: molecular insights and diagnostic approach. *Blood* 2013;122:2162-6.
13. Balwani M, et al. The porphyrias: advances in diagnosis and treatment. *Blood* 2012;120:4496-504.
14. Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2014;124:2804-11.
15. George JN. Syndromes of thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med* 2014;371:654-66.
16. Van Bijnen ST, et al. Mechanisms and clinical implications of thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Thromb Haemost* 2012;10:1-10.
17. Engert A, et al. The European Hematology Association roadmap for European hematology research: a consensus document. *Haematologica* 2016;101:115-208.
18. McLean E, et al. Worldwide prevalence of anaemia, WHO Vitamin and Mineral Nutrition Information System, 1993-2005. *Public Health Nutr* 2009;12:444-54.
19. Kassebaum NJ, et al. A systematic analysis of global anemia burden from 1990 to 2010. *Blood* 2013;123:615-24.

ONTVANGEN 1 NOVEMBER 2016, GEACCEPTEERD 12 JANUARI 2017.