

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

**Titel: Implementatie van een geautomatiseerd, diagnostisch anemieprotocol**

Auteur: Morane Swennen  
Supervisor: Dr. Jan Emmerechts  
Datum: 15/09/2024

**CLINICAL BOTTOM LINE**

---

Hoewel preoperatieve anemie een frequent voorkomende conditie is die aanleiding kan geven tot peri- en postoperatieve complicaties, wordt dit zelden preoperatief uitgewerkt en gecorrigeerd. Dit is te wijten aan het ontbreken van een helder kader dat stelt wie hiervoor de verantwoordelijkheid dient op te nemen, maar ook aan het gebrek aan standaardisatie van de uitwerking en de interpretatie van een vastgestelde anemie. Het doel van dit onderzoek was dan ook om in eerste instantie in de literatuur op zoek te gaan naar gepubliceerde protocollen aan de hand waarvan de oorzaak van een vastgestelde anemie geïdentificeerd kan worden. Op basis hiervan werd vervolgens een eigen, geautomatiseerd protocol voor de uitwerking en interpretatie van een vastgestelde anemie opgesteld en geïmplementeerd.

Aan de hand van het literatuuronderzoek werden er elf protocollen geselecteerd die zich toespitsen op de diagnostische uitwerking van een (preoperatieve) anemie. Na een grondige studie van elk protocol en het afwegen van hun voor- en nadelen, werd er geopteerd om een eigen anemieprotocol op te stellen. Dit anemieprotocol is grotendeels gebaseerd op twee van de elf protocollen en werd aangepast aan de referentiewaarden die gehanteerd worden in AZ Sint-Jan Brugge. De analyses die deel uitmaken van het anemieprotocol worden automatisch toegevoegd aan het order wanneer een anemie wordt vastgesteld, waarna een automatische interpretatie volgt. De implementatie van dit anemieprotocol zorgt bijgevolg voor een automatisatie en standaardisatie van de uitwerking en interpretatie van een vastgestelde anemie.

Hoewel het protocol reeds technisch werd gevalideerd, volgt er in een tweede fase een klinische validatie in samenwerking met de artsen van de dienst hematologie.

## TABLE OF CONTENTS

---

### INHOUD

<b>ABBREVIATIONS</b> .....	4
<b>CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO</b> .....	6
<b>QUESTIONS</b> .....	7
<b>SEARCH TERMS</b> .....	7
<b>RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES</b> .....	8
<b>APPRAISAL</b> .....	13
<b>I. Inleiding</b> .....	13
1.1 Anemie .....	13
1.2 Soorten anemie .....	13
1.2.1 Ferriprievae anemie .....	13
1.2.2 Megaloblastische anemie .....	14
1.2.3 Anemie door chronische ziekte of infectie .....	14
1.2.4 Hemoglobinopathie .....	15
1.2.5 Sideroblastische anemie .....	16
1.2.6 Beenmergaandoeningen .....	16
1.2.7 Anemie door nieraandoeningen .....	17
1.2.8 Anemie door bloedverlies .....	17
1.2.9 Aangeboren hemolytische anemie .....	17
1.2.10 Verworven hemolytische anemie .....	18
1.3 Parameters gebruikt bij de exploratie van anemie .....	20
1.3.1 Klassieke parameters .....	20
1.3.2 Nieuwere parameters .....	23
<b>2. Resultaten en discussie</b> .....	24
2.1 Protocollen .....	24
2.2 Finaal protocol .....	31
<b>3. Praktische uitwerking en implementatie van het protocol</b> .....	32
3.1 Technische aspecten .....	32
3.1.1 Automatisch toevoegen van stalen en testen .....	32
3.1.2 Interpretatie volgens het automatisch anemieprotocol .....	32
3.2 Technische validatie van de programmatie in het LIS .....	33
3.3 Preliminare data klinische validatie .....	33
<b>4. Besluit</b> .....	33
<b>TO DO/ACTIONS</b> .....	34
<b>ATTACHMENTS</b> .....	34
Tabel A2: Cut-offs voor anemie (56,57,58,59,60) .....	35
Tabel A3: Referentiewaarden bij volwassenen ouder dan 18 jaar (59,61) .....	36
Figuur 2: Protocol 1 – Origineel NHG-stroomschema voor aanvullende onderzoeken bij anemie (68,69) .....	39
Figuur 3: Protocol 2 – Alternatief stroomschema volgens Oosterhuis et al. (69) .....	40
Figuur 4: Protocol 3 – Geactualiseerd NHG-stroomschema voor aanvullende onderzoeken bij anemie (68). (N = normaal) .....	41
Figuur 5: Protocol 4 – Protocol voor diagnose en behandeling van preoperatieve anemie volgens Stockman et al. (71) .....	42
Figuur 6: Protocol 5.1 – Protocol voor de uitwerking van microcytaire anemie volgens Buttarello (67) .....	43
Figuur 7: Protocol 5.2 – Protocol voor de uitwerking van normocytaire anemie volgens Buttarello (67) .....	44
Figuur 8: Protocol 5.3 – Protocol voor de uitwerking van macrocytaire anemie volgens Buttarello (67) .....	45

<i>Figuur 9: Protocol 6 – Protocol voor de diagnose en behandeling van preoperatieve anemie met nadruk op ijzerdeficiëntie volgens Greenberg et al. (3).</i>	46
<i>Figuur 10: Protocol 7 – Protocol voor de uitwerking van preoperatieve anemie volgens Bisbe et al. (4).</i>	47
<i>Figuur 11: Protocol 8 – Protocol voor de uitwerking van preoperatieve anemie met inbegrip van richtlijnen voor behandeling volgens Munting et al. (73).</i>	48
<i>Figuur 12: Protocol 9 – Originele Thomas plot voor patiënten met een CRP kleiner of gelijk aan 5 mg/L volgens Thomas et al. (74).</i>	49
<i>Figuur 13: Protocol 9 – Originele Thomas plot voor patiënten met een CRP groter dan 5 mg/L volgens Thomas et al. (74).</i>	50
<i>Figuur 14: Protocol 10 – Alternatieve Thomas plot volgens de Leur et al. (81).</i>	51
<i>Figuur 15: Protocol 11 – Hema-Plot volgens Weimann et al. (83).</i>	52
<i>Figuur 16: Finaal protocol voor de diagnostische uitwerking van (preoperatieve) anemie.</i>	53

## ABBREVIATIONS

Afkorting	Term
ACZ	Anemie door chronische ziekte
ALL	Acute lymfoïde leukemie
AML	Acute myeloïde leukemie
BP	Bloedplaatjes
BSE	Bezinkingsnelheid van erythrocyten
CBC	<i>Complete blood count</i>
CDA	Congenitale dyserythroëtische anemie
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CHr	Reticulocyten hemoglobinegehalte
CKD-EPI	<i>Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration</i>
CML	Chronische myeloïde leukemie
CNI	Chronische nierinsufficiëntie
CRP	<i>C-reactive protein</i>
Delta-He	Delta-hemoglobine
DNA	Desoxyribonucleïnezuur
eGFR	<i>Estimated glomerular filtration rate</i>
EPO	Erythropoëtine
FA	Ferriprive anemie
FER	Ferritine
FLAER	Fluorescent aerolysine
GPI	Glycosylfosfatidylinositol
G6PDH	Glucose-6-fosfaat dehydrogenase
Hb	Hemoglobine
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
Hypo-He	Hypochrome erythrocyten
INR	<i>International Normalized Ratio</i>
IRF	Immature reticulocytenfractie
IV	Intraveneus
LDH	Lactaat dehydrogenase
LIS	Laboratoriuminformatiesysteem
MCHC	<i>Mean corpuscular hemoglobin concentration</i>
MCV	<i>Mean corpuscular volume</i>
MDRD	<i>Modification of Diet in Renal Diseases Study Group</i>
MicroR	Microcytaire rode bloedcellen
MDS	Myelodysplastisch syndroom
NHG	Nederlands Huisartsen Genootschap
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide fosfaat
PNH	Paroxysmale nachtelijke hematurie
RBC	Rode bloedcellen
RDW	<i>Red cell distribution width</i>
RET	Reticulocyten
RET-He	Reticulocyten hemoglobinegehalte
rHuEPO	Recombinant humaan erythropoëtine
RIZIV	Rijksinstituut voor Ziekte- en Invaliditeitsverzekering
RPI	Reticulocyten productie index

Afkorting	Term
sTfR	Oplosbare transferrinereceptor
TRF	Transferrine
TTP	Trombotische trombocytopenische purpura
VOE	Vooropname-eenheid
vWF	Von Willebrandfactor
WBC	Witte bloedcellen
WHO	<i>World Health Organization</i>

De vooropname-eenheid (VOE) is een entiteit die binnen AZ Sint-Jan Brugge werd opgericht om patiënten die een electieve ingreep zullen ondergaan optimaal en op een gestandaardiseerde manier te kunnen begeleiden, zowel op administratief, medisch als verpleegkundig vlak. Om dit te realiseren komen patiënten twee tot drie weken voorafgaand aan de ingreep langs op de VOE. Hierdoor krijgen patiënten de kans om eventuele vragen of bedenkingen die na de initiële consultatie zijn ontstaan alsnog te stellen of kunnen ze bijkomende informatie krijgen. Bovendien laat de VOE toe om eventuele problemen of risicofactoren, zoals bijvoorbeeld de inname van anticoagulantia, op te sporen en aan te pakken, waardoor de geplande ingreep niet in het gedrang komt en mogelijke complicaties vermeden kunnen worden.

Een voorbeeld van een conditie die aanleiding kan geven tot complicaties is preoperatieve anemie, dewelke naargelang de leeftijd, comorbiditeiten, geslacht, onderliggende pathologie en de gebruikte *cut-off* een prevalentie kent die varieert van 28 % tot 75 % en daarmee deze van de globale populatie overstijgt (1,2,3). Een lokaal onderzoek in AZ Sint-Jan Brugge toonde overigens aan dat de prevalentie van patiënten met een preoperatieve hemoglobineconcentratie (Hb-concentratie) lager dan 12.0 g/dL 35 % bedroeg in 2019. De meest voorkomende oorzaken hiervan zijn acuut of chronisch bloedverlies, chemo- en radiotherapie, nutritionele deficiënties en geneesmiddeleninteracties.

Hoewel preoperatieve anemie aanleiding kan geven tot postoperatieve complicaties, wordt deze zelden adequaat behandeld. Zo wees een enquête bij anesthesiedepartementen in Spanje uit dat minder dan 40 % van de patiënten die in aanmerking kwamen daadwerkelijk behandeld werden voor preoperatieve anemie (4). Dit is enerzijds te wijten aan het aanzien van (milde) preoperatieve anemie als een relatief banale conditie, en anderzijds aan het ontbreken van een helder kader dat stelt wie verantwoordelijkheid dient op te nemen voor de uitwerking en de behandeling ervan (1). Bovendien wordt er verkeerd gedacht dat de kosten voor de behandeling van preoperatieve anemie bij risicopatiënten groter zijn dan wanneer deze patiënten niet vooraf behandeld worden (4). De onderschatting van het potentiële risico en de gevolgen van preoperatieve anemie is echter onterecht. Zo is de ernst van preoperatieve anemie geassocieerd met een langere verblijfsduur in het ziekenhuis en kennen deze patiënten een hogere 30-dagen mortaliteit, evenals een hogere incidentie van acute nierschade en infecties ten opzichte van niet-anemische patiënten (3,5,6). Daarnaast hebben patiënten met preoperatieve anemie die cardiale chirurgie ondergaan een groter risico op beroertes (7). Ook kan preoperatieve anemie aanleiding geven tot een nood aan perioperatieve rode bloedceltransfusies (RBC-transfusies), dewelke risico's en bijkomende kosten met zich meebrengen. Er is namelijk een dosisafhankelijke relatie tussen het aantal toegediende eenheden RBC tijdens de operatie enerzijds en de mortaliteit en morbiditeit anderzijds (waaronder sepsis, nierdysfunctie, wond- en pulmonale complicaties) (8,9,10,11).

Naar aanleiding van deze vaststellingen wordt er steeds meer ingezet op *Patient Blood Management*, dewelke de focus van het transfusieproduct verlegt naar de patiënt door in te zetten op het optimaliseren van de RBC-massa, het reduceren van bloedverlies en bloedingen en het optimaliseren van de tolerantie van de patiënt ten opzichte van anemie (12). Het bevorderen van de RBC-massa kan bewerkstelligd worden door minstens vier tot acht weken voorafgaand aan de operatie de *complete blood count* (CBC), serumferritine (serum-FER), transferrinesaturatie (TRF-saturatie), *C-reactive protein* (CRP), *estimated glomerular filtration rate* (eGFR), creatinine en bij patiënten ouder dan 65 jaar vitamine B<sub>12</sub> en foliumzuur te bepalen indien deze patiënten een operatie zullen ondergaan met een verwacht bloedverlies van minstens 500 mL of waarbij de kans op een transfusie minstens 10 % bedraagt, waarna de oorzaak van de anemie behandeld dient te worden alvorens het aanvatten van de operatie, zoals wordt aanbevolen door de *International Consensus Conference on Patient Blood Management* (1,2,3,4,13). Door gericht de oorzaak aan te pakken wordt een correctie van de anemie van voorbijgaande aard door middel van transfusies vermeden. Een reductie van bloedverlies kan worden gerealiseerd door een anamnese waarin wordt gepolst naar bloedingshistoriek, geneesmiddelengebruik (anticoagulantia en anti-aggregantia) en familiale voorgeschiedenis. Bovendien draagt de selectie van geschikte chirurgische technieken hiertoe bij. Tot slot kan de tolerantie van de patiënt voor anemie verhoogd worden door een adequate monitoring. Zo kan er door middel van het verhogen van de ingeademde zuurstoffractie gecompenseerd worden voor anemie. Daarnaast wordt een restrictieve *cut-off* voor perioperatieve transfusies (Hb < 7.0 g/dL) aanbevolen, aangezien deze niet inferieur is ten opzichte van een meer liberale *cut-off* (Hb < 10.0 g/dL) (11,14,15). Een uitzondering op deze regel zijn cardiovasculair belaste patiënten, dewelke een intermediaire *cut-off* (Hb < 8.0 g/dL) nopen (16,17). Na transfusie wordt er gestreefd naar een Hb-concentratie van 7.0 tot 9.0 g/dL, waarna een herevaluatie uitgevoerd dient te worden alvorens het toedienen van bijkomende eenheden RBC.

Aangezien preoperatieve anemie gedefinieerd wordt aan de hand van een Hb-concentratie beneden een welbepaalde ondergrens, zijn hier inherent enkele nadelen aan verbonden. Zo verschillen *cut-offs* naargelang de instelling die deze voorziet, waardoor er verscheidene referentiewaarden beschikbaar zijn. Bovendien wordt er steeds meer voorgesteld om patiënten die chirurgie zullen ondergaan te aanschouwen als verschillend ten opzichte van de algemene bevolking in termen van Hb-concentraties, naar aanleiding waarvan het aanbevolen wordt om andere *cut-offs* te hanteren voor het opsporen van preoperatieve anemie (2). Omwille van het lager circulerend bloedvolume bij vrouwen ten opzichte van mannen, zal er bij vrouwen namelijk procentueel meer bloedverlies

optreden bij eenzelfde chirurgische ingreep en is er bijgevolg een grotere kans op transfusie (18,19). Daarom wordt er geadviseerd om te streven naar een preoperatieve Hb-concentratie van minstens 13.0 g/dL (in tegenstelling tot de *cut-off* voor perioperatieve transfusies: 7.0 g/dL), onafhankelijk van het geslacht van de patiënt.

Tot op heden is het opsporen van een anemie op de VOE hoofdzakelijk gebaseerd op de bepaling van de CBC, de Hb-concentratie en het *mean corpuscular volume* (MCV) van de patiënt, al dan niet aangevuld door een bepaling van ijzerparameters en het vitamine B<sub>12</sub>- en foliumzuurgehalte. Omwille van het ontbreken van geautomatiseerde algoritmes dewelke de anemie verder uitwerken én van een systematisch beleid dat stelt wie hiervoor de verantwoordelijkheid dient op te nemen, blijft de oorzaak echter vaak ongekend en onbehandeld. Bovendien geeft dit aanleiding tot een gebrek aan standaardisatie wat de interpretatie van de uitgevoerde analyses betreft. In Nederland maken daarentegen 64 % van de laboratoria gebruik van geautomatiseerde protocollen met reflextesten, waarna de resultaten al dan niet voorzien worden van een interpretatief commentaar door de klinisch bioloog (20). Dankzij dergelijke protocollen met bijhorende automatische testen is het finale resultaat sneller gekend dan wanneer de bijkomende testen manueel worden aangevraagd en worden verschillen in aanvraaggedrag en interpretatie tussen collega's uitgesloten. Bovendien wordt er vermeden dat patiënten meermaals terug moeten komen voor een nieuwe bloedafname indien blijkt dat een verdere uitwerking van de anemie nodig is.

Het doel van deze CAT is dan ook om in eerste instantie op zoek te gaan naar gepubliceerde protocollen aan de hand waarvan de oorzaak van een vastgestelde anemie geïdentificeerd kan worden, enerzijds in een preoperatieve setting, maar ook bij de routinevalidatie door de klinisch bioloog in het laboratorium. De **implementatie** van een dergelijk protocol in de praktijk moet vervolgens toelaten om het proces te **automatiseren** en een standaardisatie van de **interpretatie** te realiseren. De focus van dit onderzoek ligt bijgevolg op de implementatie en automatisatie van een dergelijk protocol, eerder dan op het aanreiken van richtlijnen voor de behandeling van preoperatieve anemie.

## QUESTIONS

---

- 1) Welke gepubliceerde protocollen zijn beschikbaar voor de opsporing van (preoperatieve) anemie?
- 2) Welk van deze protocollen is het meest geschikt voor implementatie in de praktijk?

## SEARCH TERMS

---

Naar aanleiding van de literatuurstudie werd de database van PubMed doorzocht aan de hand van de volgende zoektermen: "laboratory diagnosis", "anemia", "anemia prevalence", "iron deficiency anemia", "megaloblastic anemia", "protocol", "anemia protocol", "diagnostic protocol", "diagnostic plot", "diagnostic value", "Thomas plot", "Hema plot", "reticulocytes", "reticulocyte indices". Daarnaast werden naslagwerken van internationale instanties zoals de *World Health Organization* (WHO), *American Society of Hematology* en *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) geconsulteerd.

## RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

---

[A] Richtlijnen en Aanbevelingen

[B] Systematic Reviews en Meta-analyses

[C] Reviews

[D] Originele Artikels

[E] Referentiewerken, Handboeken en Databases

[F] Posters, "grey literature", presentaties

1. [C] Gómez-Ramírez S, Jericó C, Muñoz M. Perioperative anemia: Prevalence, consequences and pathophysiology. *Transfus Apher Sci.* 2019;58(4):369-374. doi: 10.1016/j.transci.2019.06.011. Epub 2019. PMID: 31416710.
2. [C] Muñoz M, Gómez-Ramírez S, Kozek-Langenecker S, Shander A, Richards T, Pavia J, Kehlet H, Acheson AG, Evans C, Raobaikady R, Javidrooz M, Auerbach M. 'Fit to fly': overcoming barriers to preoperative haemoglobin optimization in surgical patients. *Br J Anaesth.* 2015;115(1):15-24. doi: 10.1093/bja/aev165. PMID: 26089443.
3. [C] Greenberg JA, Zwiap TM, Sadek J, Malcolm JC, Mullen KA, McIsaac DI, Musselman RP, Moloo H. Clinical practice guideline: evidence, recommendations and algorithm for the preoperative optimization of anemia, hyperglycemia and smoking. *Can J Surg.* 2021;64(5):E491-E509. doi: 10.1503/cjs.011519. Erratum in: *Can J Surg.* 2021;64(6):E619. PMID: 34598927; PMCID: PMC8526150.
4. [C] Bisbe E, Basora M, Colomina MJ; Spanish Best Practice in Peri-operative Anaemia Optimisation Panel. Peri-operative treatment of anaemia in major orthopaedic surgery: a practical approach from Spain. *Blood Transfus.* 2017;15(4):296-306. doi: 10.2450/2017.0177-16. Epub 2017. PMID: 28151388; PMCID: PMC5490724.
5. [B] Fowler AJ, Ahmad T, Phull MK, Allard S, Gillies MA, Pearse RM. Meta-analysis of the association between preoperative anaemia and mortality after surgery. *Br J Surg.* 2015;102(11):1314-24. doi: 10.1002/bjs.9861. PMID: 26349842.
6. [D] Leichtle SW, Mouawad NJ, Lampman R, Singal B, Cleary RK. Does preoperative anemia adversely affect colon and rectal surgery outcomes? *J Am Coll Surg.* 2011;212(2):187-94. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2010.09.013. PMID: 21276532.
7. [D] Ranucci M, Di Dedda U, Castelvechio S, Menicanti L, Frigiola A, Pelissero G; Surgical and Clinical Outcome Research (SCORE) Group. Impact of preoperative anemia on outcome in adult cardiac surgery: a propensity-matched analysis. *Ann Thorac Surg.* 2012;94(4):1134-41. doi: 10.1016/j.athoracsurg.2012.04.042. Epub 2012. PMID: 22698773.
8. [D] Ferraris VA, Davenport DL, Saha SP, Austin PC, Zwischenberger JB. Surgical outcomes and transfusion of minimal amounts of blood in the operating room. *Arch Surg.* 2012;147(1):49-55. doi: 10.1001/archsurg.2011.790. PMID: 22250113.
9. [C] Marik PE, Corwin HL. Efficacy of red blood cell transfusion in the critically ill: a systematic review of the literature. *Crit Care Med.* 2008;36(9):2667-74. doi: 10.1097/CCM.0b013e3181844677. Erratum in: *Crit Care Med.* 2008;36(11):3134. PMID: 18679112.
10. [B] Hill GE, Frawley WH, Griffith KE, Forestner JE, Minei JP. Allogeneic blood transfusion increases the risk of postoperative bacterial infection: a meta-analysis. *J Trauma.* 2003;54(5):908-14. doi: 10.1097/01.TA.0000022460.21283.53. PMID: 12777903.
11. [B] Acheson AG, Brookes MJ, Spahn DR. Effects of allogeneic red blood cell transfusions on clinical outcomes in patients undergoing colorectal cancer surgery: a systematic review and meta-analysis. *Ann Surg.* 2012;256(2):235-44. doi: 10.1097/SLA.0b013e31825b35d5. PMID: 22791100.
12. [C] Desai N, Schofield N, Richards T. Perioperative Patient Blood Management to Improve Outcomes. *Anesth Analg.* 2018;127(5):1211-1220. doi: 10.1213/ANE.0000000000002549. PMID: 29064875.
13. [A] Kozek-Langenecker SA, Ahmed AB, Afshari A, Albaladejo P, Aldecoa C, Barauskas G, De Robertis E, Faraoni D, Filipescu DC, Fries D, Haas T, Jacob M, Lancé MD, Pitarch JVL, Mallett S, Meier J, Molnar ZL, Rahe-Meyer N, Samama CM, Stensballe J, Van der Linden PJF, Wikkelsø AJ, Wouters P, Wyffels P, Zacharowski K. Management of severe perioperative bleeding: guidelines from the European Society of Anaesthesiology: First update 2016. *Eur J Anaesthesiol.* 2017;34(6):332-395. doi: 10.1097/EJA.0000000000000630. PMID: 28459785.
14. [B] Holst LB, Petersen MW, Haase N, Perner A, Wetterslev J. Restrictive versus liberal transfusion strategy for red blood cell transfusion: systematic review of randomised trials with meta-analysis and trial sequential analysis. *BMJ.* 2015 24;350:h1354. doi: 10.1136/bmj.h1354. PMID: 25805204; PMCID: PMC4372223.
15. [D] Hébert PC, Wells G, Blajchman MA, Marshall J, Martin C, Pagliarello G, Tweeddale M, Schweitzer I, Yetisir E. A multicenter, randomized, controlled clinical trial of transfusion requirements in critical care. Transfusion Requirements in Critical Care Investigators, Canadian Critical Care Trials Group. *N Engl J*



- Med. 1999;340(6):409-17. doi: 10.1056/NEJM199902113400601. Erratum in: N Engl J Med 1999;340(13):1056. PMID: 9971864.
16. **[E]** Boogaerts M, Verhoef G. Klinische hematologie. Iste editie. Leuven: LannooCampus; 2019. 265 p.
  17. **[A]** Padhi S, Kemmis-Betty S, Rajesh S, Hill J, Murphy MF; Guideline Development Group. Blood transfusion: summary of NICE guidance. *BMJ*. 2015;351:h5832. doi: 10.1136/bmj.h5832. PMID: 26581483.
  18. **[D]** Rosencher N, Kerckamp HE, Macheras G, Munuera LM, Menichella G, Barton DM, Cremers S, Abraham IL; OSTHEO Investigation. Orthopedic Surgery Transfusion Hemoglobin European Overview (OSTHEO) study: blood management in elective knee and hip arthroplasty in Europe. *Transfusion*. 2003;43(4):459-69. doi: 10.1046/j.1537-2995.2003.00348.x. PMID: 12662278.
  19. **[C]** Mosieri C, Chandler D, Reed DS, Craig MK, Hyatali F, Kallurkar A, Cornett EM, Urman RD, Kaye AD. Managing preoperative anemia: Evolving concepts and strategies for improving patient outcomes. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2020;34(2):183-197. doi: 10.1016/j.bpa.2020.04.005. Epub 2020. PMID: 32711828.
  20. **[D]** van de Verboeket WPHG, JFWK V, Oosterhuis WP, Leers MPG. Diagnostische waarde van een beknopt anemieprotocol gebaseerd op tien laboratoriumparameters. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk*. 2011;36(4):275-276.
  21. **[E]** World Health Organization. Anaemia [Internet]. Genève: World Health Organization; 1 mei 2023 [Geraadpleegd op 4 december 2023]. Beschikbaar via: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/anaemia>
  22. **[E]** Hoffmann JJML, Akkerman JWN, Nieuwenhuis HK, Overbeeke MAM, van Koningsbruggen WTJM. Hematologie. 2de editie. Arnhem: Syntax Media; 2007. 379 p.
  23. **[E]** The Institute for Health Metrics and Evaluation [Internet]. Seattle: The Institute for Health Metrics and Evaluation; 31 juli 2023 [Geraadpleegd op 7 december 2023]. Beschikbaar via: <https://www.healthdata.org/news-events/newsroom/news-releases/lancet-new-study-reveals-global-anemia-cases-remain-persistently#:~:text=One%2Dfourth%20of%20the%20global,million%20cases%20over%20three%20decades>.
  24. **[D]** GBD 2021 Anaemia Collaborators. Prevalence, years lived with disability, and trends in anaemia burden by severity and cause, 1990-2021: findings from the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet Haematol*. 2023;10(9):e713-e734. doi: 10.1016/S2352-3026(23)00160-6. Epub 2023. Erratum in: *Lancet Haematol*. 2023;10(10):e796. PMID: 37536353; PMCID: PMC10465717.
  25. **[C]** Chaparro CM, Suchdev PS. Anemia epidemiology, pathophysiology, and etiology in low- and middle-income countries. *Ann N Y Acad Sci*. 2019;1450(1):15-31. doi: 10.1111/nyas.14092. Epub 2019. PMID: 31008520; PMCID: PMC6697587.
  26. **[C]** Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med*. 1999;341(26):1986-95. doi: 10.1056/NEJM199912233412607. Erratum in: *N Engl J Med* 2000;342(5):364. PMID: 10607817.
  27. **[C]** Kumar A, Sharma E, Marley A, Samaan MA, Brookes MJ. Iron deficiency anaemia: pathophysiology, assessment, practical management. *BMJ Open Gastroenterol*. 2022;9(1):e000759. doi: 10.1136/bmjgast-2021-000759. PMID: 34996762; PMCID: PMC8744124.
  28. **[C]** Tandara L, Salamunic I. Iron metabolism: current facts and future directions. *Biochem Med (Zagreb)*. 2012;22(3):311-28. doi: 10.11613/bm.2012.034. PMID: 23092063; PMCID: PMC3900049.
  29. **[C]** Nemeth E, Ganz T. Hpcidin-Ferroportin Interaction Controls Systemic Iron Homeostasis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(12):6493. doi: 10.3390/ijms22126493. PMID: 34204327; PMCID: PMC8235187.
  30. **[A]** World Health Organisation. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity [Internet]. Genève: World Health Organization; 31 mei 2011 [Geraadpleegd op 12 december 2023]. Beschikbaar via [https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/85839/WHO\\_NMH\\_NHD\\_MNM\\_11.1\\_eng.pdf?sequence=2](https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/85839/WHO_NMH_NHD_MNM_11.1_eng.pdf?sequence=2)
  31. **[C]** Cappellini MD, Musallam KM, Taher AT. Iron deficiency anaemia revisited. *J Intern Med*. 2020;287(2):153-170. doi: 10.1111/joim.13004. Epub 2019 Nov 12. PMID: 31665543.
  32. **[C]** Socha DS, DeSouza SI, Flagg A, Sekeres M, Rogers HJ. Severe megaloblastic anemia: Vitamin deficiency and other causes. *Cleve Clin J Med*. 2020;87(3):153-164. doi: 10.3949/ccjm.87a.19072. PMID: 32127439.
  33. **[C]** Wright AJ, Dainty JR, Finglas PM. Folic acid metabolism in human subjects revisited: potential implications for proposed mandatory folic acid fortification in the UK. *Br J Nutr*. 2007;98(4):667-75. doi: 10.1017/S0007114507777140. Epub 2007. PMID: 17617936.
  34. **[C]** Gille D, Schmid A. Vitamin B12 in meat and dairy products. *Nutr Rev*. 2015;73(2):106-15. doi: 10.1093/nutrit/nuu011. PMID: 26024497.
  35. **[C]** Shane B. Folate and vitamin B12 metabolism: overview and interaction with riboflavin, vitamin B6, and polymorphisms. *Food Nutr Bull*. 2008;29(2 Suppl):S5-16; discussion S17-9. doi: 10.1177/15648265080292S103. PMID: 18709878.
  36. **[D]** Guida C, Altamura S, Klein FA, Galy B, Boutros M, Ulmer AJ, Hentze MW, Muckenthaler MU. A novel inflammatory pathway mediating rapid hepcidin-independent hypoferraemia. *Blood*. 2015;125(14):2265-75. doi: 10.1182/blood-2014-08-595256. Epub 2015. PMID: 25662334; PMCID: PMC4383800.

37. **[C]** Gasche C, Lomer MC, Cavill I, Weiss G. Iron, anaemia, and inflammatory bowel diseases. *Gut*. 2004;53(8):1190-7. doi: 10.1136/gut.2003.035758. PMID: 15247190; PMCID: PMC1774131.
38. **[F]** van Rossum A, Boesten LSM, Vlasveld LT, Swinkels DW. IJzerdiagnostiek. *Ned Tijdschr Geneeskd* [Internet]. 2011 [Geraadpleegd op 6 februari 2024];155:A2940. Beschikbaar via <https://www.ntvg.nl/artikelen/ijzerdiagnostiek>
39. **[C]** Thom CS, Dickson CF, Gell DA, Weiss MJ. Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(3):a011858. doi: 10.1101/cshperspect.a011858. PMID: 23388674; PMCID: PMC3579210.
40. **[F]** Takemoto CM. Hemoglobin variants including Hb C, Hb D and Hb E [Internet]. UpToDate; 12 januari 2023 [Geraadpleegd op 11 december 2023]. Beschikbaar via: [https://www.uptodate-com.kuleuven.e-bronnen.be/contents/hemoglobin-variants-including-hb-c-hb-d-and-hb-e?search=hemoglobin%20variants&source=search\\_result&selectedTitle=1~150&usage\\_type=default&display\\_rank=1](https://www.uptodate-com.kuleuven.e-bronnen.be/contents/hemoglobin-variants-including-hb-c-hb-d-and-hb-e?search=hemoglobin%20variants&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1)
41. **[F]** Hematologie Groningen. Anemie [Internet]. Groningen: Hematologie Groningen; s.d. [Geraadpleegd op 12 december 2023]. Beschikbaar via: [https://hematologieg groningen.nl/patienten/content/3anemie.htm?zoom\\_highlightsub=thalassemie](https://hematologieg groningen.nl/patienten/content/3anemie.htm?zoom_highlightsub=thalassemie)
42. **[C]** Sanchez-Villalobos M, Blanquer M, Moraleda JM, Salido EJ, Perez-Oliva AB. New Insights Into Pathophysiology of  $\beta$ -Thalassemia. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9:880752. doi: 10.3389/fmed.2022.880752. PMID: 35492364; PMCID: PMC9041707.
43. **[E]** Bain BJ. Haemoglobinopathy Diagnosis. 1<sup>ste</sup> editie. Hoboken: John Wiley and Sons Ltd;2001. 260 p.
44. **[D]** Vehapoglu A, Ozgurhan G, Demir AD, Uzuner S, Nursoy MA, Turkmen S, Kacan A. Hematological indices for differential diagnosis of Beta thalassemia trait and iron deficiency anemia. *Anemia*. 2014;2014:576738. doi: 10.1155/2014/576738. Epub 2014. PMID: 24818016; PMCID: PMC4003757.
45. **[D]** Amid A, Haghi-Ashtiani B, Kirby-Allen M, Haghi-Ashtiani MT. Screening for thalassemia carriers in populations with a high rate of iron deficiency: revisiting the applicability of the Mentzer Index and the effect of iron deficiency on Hb A2 levels. *Hemoglobin*. 2015;39(2):141-3. doi: 10.3109/03630269.2015.1024321. Epub 2015. PMID: 25806419.
46. **[E]** Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4de editie. Lyon: IARC; 2017. 585 p.
47. **[C]** Shaikh H, Hashmi MF, Aeddula NR. Anemia of Chronic Renal Disease. [Updated 2023 Feb 24]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539871/>
48. **[F]** Narla A, Sandoval C. Overview of causes of anemia in children due to decreased red blood cell production [Internet]. Massachusetts: UpToDate; 1 mei 2023 [Geraadpleegd op 6 februari 2024]. Beschikbaar via [https://www.uptodate-com.kuleuven.e-bronnen.be/contents/overview-of-causes-of-anemia-in-children-due-to-decreased-red-blood-cell-production?search=overview%20of%20causes%20of%20anemia%20in%20children%20due%20to%20decreased%20red%20blood%20cell%20production&source=search\\_result&selectedTitle=1~150&usage\\_type=default&display\\_rank=1](https://www.uptodate-com.kuleuven.e-bronnen.be/contents/overview-of-causes-of-anemia-in-children-due-to-decreased-red-blood-cell-production?search=overview%20of%20causes%20of%20anemia%20in%20children%20due%20to%20decreased%20red%20blood%20cell%20production&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1)
49. **[C]** Deguise MO, Blain S, Simpson E, Liebman M, Ferretti E. Congenital dyserythropoietic anemia type IV in the genetic era: A rare neonatal case report of rapid identification with a review of the literature. *Pediatr Blood Cancer*. 2023;70(5):e30245. doi: 10.1002/pbc.30245. Epub 2023. PMID: 36798023.
50. **[D]** Iolascon A, Delaunay J, Wickramasinghe SN, Perrotta S, Gigante M, Camaschella C. Natural history of congenital dyserythropoietic anemia type II. *Blood*. 2001;98(4):1258-60. doi: 10.1182/blood.v98.4.1258. PMID: 11493480.)
51. **[D]** Hill A, Platts PJ, Smith A et al. The incidence and prevalence of par-oxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and survival of patients in Yorkshire. *Blood*. 2006;108(11):985.
52. **[D]** Jalbert JJ, Chaudhari U, Zhang H, Weyne J, Shammo JM. Epidemiology of PNH and real-world treatment patterns following an incident PNH diagnosis in the US. *Blood*. 2019;134(1):3407.
53. **[C]** Devos T, Meers S, Boeckx N, Gothot A, Deeren D, Chatelain B, Chatelain C, Devalet B. Diagnosis and management of PNH: Review and recommendations from a Belgian expert panel. *Eur J Haematol*. 2018;101(6):737-749. doi: 10.1111/ejh.13166. Epub 2018. PMID: 30171728.
54. **[D]** Tufano A, Polimeno M, Matani B, Cardillo G, Capasso F, Mormile R, Paladino F, Di Minno G. Validation of PLASMIC score in a cohort of patients with suspected thrombotic microangiopathy in an academic medical centre. *Blood Transfus*. 2023;21(4):345-349. doi: 10.2450/2022.0082-22. Epub 2022. PMID: 35969133; PMCID: PMC10335348.
55. **[D]** Tiscia GL, Ostuni A, Cascavilla N, Cappucci F, Scalzulli P, Battista C, Abrescia A, Aucella F, Buquicchio C, Brigante M, D'Andrea G, Di Paolo B, Giordano G, Infante B, Piano S, Ranieri P, Tullo L, Grandone E. Validation of PLASMIC score and follow-up data in a cohort of patients with suspected microangiopathies from Southern Italy. *J Thromb Thrombolysis*. 2018;46(2):174-179. doi: 10.1007/s11239-018-1674-6. PMID: 29737462.)
56. **[A]** World Health Organization. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity [Internet]. Genève: World Health Organization; s.d. [Geraadpleegd op 27 december 2023]. Beschikbaar via: [https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/85839/WHO\\_NMH\\_NHD\\_MNM\\_11.1\\_eng.pdf](https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/85839/WHO_NMH_NHD_MNM_11.1_eng.pdf)

57. **[E]** American Society of Hematology. Anemia [Internet]. Washington: American Society of Hematology; s.d. [Geraadpleegd op 27 december 2023]. Beschikbaar via: <https://www.hematology.org/education/patients/anemia>
58. **[A]** Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations to Prevent and Control iron Deficiency in the United States [Internet]. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 3 april 1998 [Geraadpleegd op 27 december 2023]. Beschikbaar via: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00051880.htm#00003038.htm>
59. **[F]** AZ Sint-Jan. Labogids [Internet]. Brugge: AZ Sint-Jan; s.d. [Geraadpleegd op 27 december 2023]. Beschikbaar via: <https://labogids.azsintjan.be/>
60. **[D]** Florin L, Oyaert M, Vandevenne M, Van den Bossche J, Vanden Driessche M, Claeys R, Marcelis L, Robbrecht J, Jacobs N, Nijs A, Janssen K, Van Ruymbeke A, de Mûelenaere G, Stove V. Establishment of common reference intervals for hematology parameters in adults, measured in a multicenter study on the Sysmex XN-series analyzer. *Int J Lab Hematol.* 2020;42(3):e110-e115. doi: 10.1111/ijlh.13151. Epub 2020. PMID: 31917886.
61. **[C]** Cascio MJ, DeLoughery TG. Anemia: Evaluation and Diagnostic Tests. *Med Clin North Am.* 2017;101(2):263-284. doi: 10.1016/j.mcna.2016.09.003. Epub 2016. PMID: 28189170.
62. **[C]** Wallerstein RO Jr. Laboratory evaluation of anemia. *West J Med.* 1987;146(4):443-51. PMID: 3577135; PMCID: PMC1307333.
63. **[E]** Bossuyt X. *Wegwijs in laboratoriumdiagnose*. 3<sup>de</sup> editie. Leuven: Acco; 2021. 536 p.
64. **[F]** Nederlands Huisartsen Genootschap. Bijlage CRP of BSE [Internet]. Utrecht: Nederlands Huisartsen Genootschap; maart 2019 [Geraadpleegd op 16 januari 2023]. Beschikbaar via: [https://richtlijnen.nhg.org/files/2021-05/LESA%20Lab%20algemeen%20bijlage\\_crp\\_of\\_bse\\_0.pdf](https://richtlijnen.nhg.org/files/2021-05/LESA%20Lab%20algemeen%20bijlage_crp_of_bse_0.pdf)
65. **[F]** Sysmex Europe GmbH. SEED Haematology: The importance of reticulocyte detection [Internet]. Norderstedt: Sysmex Europe GmbH; januari 2016 [Geraadpleegd op 22 januari 2024]. Beschikbaar via file:///C:/Users/MORASWEN/Downloads/Sysmex\_SEED\_The\_importance\_of\_reticulocyte\_detection.pdf
66. **[F]** Wienefoet C. (2024). De waarde achter de advanced RBC parameters [Powerpoint-slides]. Sysmex. Geraadpleegd op 23 januari 2024 via <https://benelux.caresphere-academy.com/archive/file/78896>
67. **[C]** Buttarello M. Laboratory diagnosis of anemia: are the old and new red cell parameters useful in classification and treatment, how? *Int J Lab Hematol.* 2016;38 Suppl 1:123-32. doi: 10.1111/ijlh.12500. Epub 2016. PMID: 27195903.
68. **[A]** Nederlands Huisartsen Genootschap. Anemie [Internet]. Utrecht: Nederlands Huisartsen Genootschap; januari 2021 [Geraadpleegd op 9 januari 2023]. Beschikbaar via: <https://richtlijnen.nhg.org/standaarden/anemie#samenvatting-richtlijnen-beleid>
69. **[D]** Oosterhuis WP, van der Horst M, van Dongen K, Ulenkate HJ, Volmer M, Wulkan RW. Prospectieve vergelijking van het stroomschema voor laboratoriumonderzoek van anemie uit de NHG-standaard 'Anemie' met een eigen, inhoudelijk en logistiek alternatief stroomschema. *Ned Tijdschr Geneesk.* 2007;151(42):2326-32. Dutch. PMID: 18064935.
70. **[C]** Bray C, Bell LN, Liang H, Haykal R, Kaiksow F, Mazza JJ, Yale SH. Erythrocyte Sedimentation Rate and C-reactive Protein Measurements and Their Relevance in Clinical Medicine. *WMJ.* 2016;115(6):317-21. PMID: 29094869.
71. **[F]** Stockman M, Hendrickx A, Peeters V. (2021). Preoperatief bloedmanagement en de parameters van het reticulocytenkanaal. [Niet-gepubliceerd Critically Appraised Topic]. KU Leuven.
72. **[C]** Gelaw Y, Woldu B, Melku M. The Role of Reticulocyte Hemoglobin Content for Diagnosis of Iron Deficiency and Iron Deficiency Anemia, and Monitoring of Iron Therapy: a Literature Review. *Clin Lab.* 2019;65(12). doi: 10.7754/Clin.Lab.2019.190315. PMID: 31850722.
73. **[C]** Munting KE, Klein AA. Optimisation of pre-operative anaemia in patients before elective major surgery - why, who, when and how? *Anaesthesia.* 2019 Jan;74 Suppl 1:49-57. doi: 10.1111/anae.14466. PMID: 30604424.
74. **[D]** Thomas C, Thomas L. Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin Chem.* 2002;48(7):1066-76. PMID: 12089176.
75. **[F]** Mayo Clinic Laboratories. Soluble Transferrin Receptor (sTfR), Serum [Internet]. Rochester: Mayo Clinic Laboratories; s.d. [Geraadpleegd op 24 januari 2024]. Beschikbaar via: <https://www.mayocliniclabs.com/test-catalog/overview/84283#Overview>
76. **[D]** Thomas L, Franck S, Messinger M, Linssen J, Thomé M, Thomas C. Reticulocyte hemoglobin measurement--comparison of two methods in the diagnosis of iron-restricted erythropoiesis. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43(11):1193-202. doi: 10.1515/CCLM.2005.207. PMID: 16232085.
77. **[D]** Enko D, Wallner F, von-Goedecke A, Hirschmugl C, Auersperg V, Halwachs-Baumann G. The impact of an algorithm-guided management of preoperative anemia in perioperative hemoglobin level and transfusion of major orthopedic surgery patients. *Anemia.* 2013;2013:641876. doi: 10.1155/2013/641876. Epub 2013. PMID: 23606953; PMCID: PMC3623389.
78. **[D]** Leers MP, Keuren JF, Oosterhuis WVP. The value of the Thomas-plot in the diagnostic work up of anemic patients referred by general practitioners. *Int J Lab Hematol.* 2010;32(6 Pt 2):572-81. doi: 10.1111/j.1751-553X.2010.01221.x. PMID: 20175793.

79. **[C]** Thomas C, Kirschbaum A, Boehm D, Thomas L. The diagnostic plot: a concept for identifying different states of iron deficiency and monitoring the response to epoetin therapy. *Med Oncol.* 2006;23(1):23-36. doi: 10.1385/MO:23:1:23. PMID: 16645227.
80. **[D]** Castel R, Tax MG, Droogendijk J, Leers MP, Beukers R, Levin MD, Sonneveld P, Berendes PB. The transferrin/log(ferritin) ratio: a new tool for the diagnosis of iron deficiency anemia. *Clin Chem Lab Med.* 2012;50(8):1343-9. doi: 10.1515/cclm-2011-0594. PMID: 22868798.
81. **[D]** de Leur K, Pouw NMC, Lopez J, Waals-Prinzen L, Ceelie H, van der Zwan-van Beek EM. The alternative Thomas-plot: A new tool for effective anemia diagnostics. *Int J Lab Hematol.* 2023;45(1):96-103. doi: 10.1111/ijlh.13964. Epub 2022. PMID: 36168666.
82. **[D]** Thomas C, Kobold U, Balan S, Roeddiger R, Thomas L. Serum hepcidin-25 may replace the ferritin index in the Thomas plot in assessing iron status in anemic patients. *Int J Lab Hematol.* 2011;33(2):187-93. doi: 10.1111/j.1751-553X.2010.01265.x. Epub 2010. PMID: 20868446.
83. **[D]** Weimann A, Cremer M, Hernáiz-Driever P, Zimmermann M. Delta-He, Ret-He and a New Diagnostic Plot for Differential Diagnosis and Therapy Monitoring of Patients Suffering from Various Disease-Specific Types of Anemia. *Clin Lab.* 2016;62(4):667-77. doi: 10.7754/clin.lab.2015.150830. PMID: 27215087.

### I. Inleiding

#### I.1 Anemie

Anemie wordt beschreven als een toestand waarbij het aantal RBC of de Hb-concentratie lager is dan normaal, rekening houdend met de leeftijd, het geslacht en de fysiologische status (21). Aangezien Hb instaat voor het transport van zuurstof doorheen het lichaam en de afgifte hiervan aan organen en weefsels, kan een tekort aanleiding geven tot onder andere vermoeidheid, kortademigheid en duizeligheid (22).

Hoewel er grote nationale verschillen zijn, werd de globale prevalentie van anemie in 2023 geschat op 25 % (23). Bovendien daalt de prevalentie van anemie naarmate de socio-economische ontwikkeling van een land toeneemt (24,25). Zo kenden landen als Zambia, Mali en Togo de hoogste prevalentie van anemie in 2021, in tegenstelling tot IJsland, Noorwegen en Monaco (24). Daarnaast hebben vrouwen over alle leeftijdsgroepen heen een groter risico op de ontwikkeling van anemie in vergelijking met mannen en worden voornamelijk jonge kinderen, zwangeren, postpartum en menstruerende vrouwen erdoor getroffen (21).

#### I.2 Soorten anemie

Er bestaan verschillende soorten anemie naargelang het ontstaansmechanisme, waarvan de meest frequente worden weergegeven in figuur 1 (zie *Appendices*) (16,22).

##### I.2.1 Ferriprievie anemie

Ijzer is een micronutriënt dat voornamelijk voorkomt in erythrocyten, maar ook in spieren, macrofagen, de milt, het beenmerg, de darmmucosa en in hepatocyten (26). Het speelt een rol in de vorming van heem en is tevens van belang voor onder andere de mitochondriale functie, celproliferatie en het herstellen van desoxyribonucleïnezuur (DNA). Een tekort geeft bijgevolg onder andere aanleiding tot een verminderde aanmaak van heem en Hb, maar interfereert ook met verschillende cellulaire processen. Een teveel aan ijzer kan daarentegen aanleiding geven tot de vorming van vrije zuurstofradicalen, dewelke orgaanschade kunnen berokkenen (27). De ijzerhuishouding dient dan ook strikt gereguleerd te worden.

De dagelijkse ijzerbehoefte van het lichaam bedraagt 25 mg (27,28). Aangezien er dagelijks slechts 1 tot 2 mg ijzer verloren gaat dankzij een recyclagesysteem, dient dit verlies gecompenseerd te worden via de voeding. Bij de passage van ijzer uit de voeding langs het duodenum wordt  $Fe^{3+}$  door duodenaal cytochroom B omgezet naar  $Fe^{2+}$ , wat vervolgens wordt opgenomen in de cel door dimetaaltransporter-1 (DMT1) (26,29). Dit wordt afgegeven aan het bloed dankzij ferroportine, waar ijzer wordt gebonden aan het transporteiwit TRF. Dit ijzer-TRF-complex bindt naderhand aan de TRF-receptor van de doelwitcel, waarna het complex geïnternaliseerd wordt. Tot slot wordt ijzer opgeslagen in de weefsels via het opslagewit FER. Bij een overmaat aan ijzer wordt de lever gestimuleerd tot de productie en vrijgave van het hormoon hepcidine, wat bindt aan de ferroportine-exporter ter hoogte van de enterocyten en macrofagen waardoor er geen ijzer meer opgenomen kan worden. Omgekeerd zal er bij een gedaald ijzergehalte minder hepcidine afgegeven worden, wat de ijzeropname doet toenemen.

Anemie door ijzertekort is met een geschatte wereldwijde prevalentie tot 30 % de meest voorkomende vorm van anemie (16,27,30). De meest voorkomende oorzaken zijn bloedverlies, bijvoorbeeld tijdens de menstruatie of bij gastro-intestinale bloedingen, en onvoldoende inname via de voeding in ontwikkelingslanden of door een vegetarisch of veganistisch dieet. Daarnaast kunnen absorptieproblemen, bijvoorbeeld na bariatrische chirurgie, en een toegenomen behoefte, bijvoorbeeld tijdens de zwangerschap of tijdens een groeispurt, bijdragen tot de ontwikkeling van ferriprievie anemie (FA) (31). Bovendien doen fyaten, calcium, tannines en fosfaten de resorptie van ijzer dalen, terwijl vitamine C deze doet toenemen. Functionele FA kan zowel ontstaan door een verminderde mobilisatie van ijzer vanuit de ijzervoorraad naar de circulatie als door een toegenomen erytropoëse (31). Deze eerste situatie doet zich voor bij toestanden van chronische inflammatie, zoals obesitas of chronisch nierfalen, terwijl endo- of exogeen erytropoëtin (EPO) deze tweede situatie kan veroorzaken. Men spreekt daarentegen van latente ijzerdeficiëntie wanneer er sprake is van een verminderde ijzervoorraad zonder dat dit de erytropoëse reeds beïnvloedt. Tot slot kunnen zeldzame genetische defecten aan de basis liggen van FA (31). Zo geven mutaties in het *TMPRSS6*-gen aanleiding tot gestegen hepcidineniveaus en een verminderde intestinale opname van ijzer.

Risicopopulaties omvatten menstruerende en zwangere vrouwen en jonge kinderen, maar ook ouderen en patiënten met chronische aandoeningen. Zo kunnen coeliakie of een infectie met *Helicobacter pylori* de absorptie van ijzer doen dalen. Deze laatste treedt namelijk in competitie met ijzer, verhoogt de pH en vermindert de beschikbaarheid van vitamine C, waardoor  $Fe^{3+}$  minder wordt omgezet naar het beter resorbeerbare  $Fe^{2+}$ .

Tijdens een laboratoriumonderzoek wijzen de aanwezigheid van een microcytaire, hypochrome anemie in combinatie met een gedaald serumijzergehalte, een gedaald FER-gehalte (*cave* positief acute fase eiwit) en een gestegen TRF-gehalte (*cave* negatief acute fase eiwit) met een gedaalde TRF-saturatie typisch op een FA (16).

Bovendien gaat FA niet zelden gepaard met een trombocytose en in ernstige gevallen met een discrete leukopenie. Naargelang de onderliggende aandoening en de ernst van de anemie variëren de symptomen – dewelke overigens vaak specifiek zijn – van moeheid en bleekheid bij milde vormen tot mucositis bij ernstige, chronische vormen. Bovendien kan de vatbaarheid voor infecties gestegen zijn.

De behandeling is in eerste instantie oorzakelijk en kan aangevuld worden met ijzersuppletie onder de vorm van ferrozouten *per os*. Deze supplementen worden idealiter 's morgens nuchter ingenomen met een glas fruitsap tot acht à twaalf weken na het corrigeren van de anemie. Uitzonderlijke gevallen vereisen een intraveneuze toediening van ijzer.

### 1.2.2 Megaloblastische anemie

Foliumzuur is een wateroplosbaar vitamine dat voornamelijk voorkomt in groenten en volkorenproducten (32). 5,10-methyleentetrahydrofolaat, de biologisch actieve vorm van foliumzuur, speelt een rol als methyl donor bij de omzetting van uracil naar thymidine en is van belang bij de ontwikkeling van de neurale buis (16). De gemiddelde lichaamsvoorraad varieert tussen 5 en 30 mg en de dagelijkse behoefte varieert tussen 400 en 600 µg naargelang de leeftijd, het geslacht en de fysiologische status. Bij de inname van voeding wordt foliumzuur ter hoogte van de *brush border* gedeconjugerd, waarna het opgenomen wordt ter hoogte van het jejunum via actief transport (33). Deze transporter is verzadigbaar en pH-afhankelijk. Vervolgens wordt het geabsorbeerde foliumzuur, al dan niet na biotransformatie, vrijgezet in het bloed en getransporteerd naar de lever, waarna een deel geëlimineerd wordt via de gal (*first-pass effect*). Dit deel kan vervolgens gerecycleerd worden via de enterohepatische circulatie, waarna het in de systeemcirculatie wordt vrijgezet en beschikbaar is voor de weefsels. Tekorten kunnen ontstaan door een te lage inname, een verminderde absorptie of een verhoogde behoefte.

Vitamine B<sub>12</sub>, een cofactor van de methylering tijdens de DNA-synthese, komt voor in producten van dierlijke oorsprong (32). De gemiddelde lichaamsvoorraad varieert tussen 3 en 5 mg en de dagelijkse behoefte varieert tussen 2 en 3 µg (34). Bij de inname van voeding wordt haptocorrine geproduceerd en vrijgezet door de speekselklieren, wat vervolgens vrij vitamine B<sub>12</sub> bindt in de maag. Bovendien zet de maag intrinsieke factor vrij, dewelke vrij vitamine B<sub>12</sub> bindt nadat deze laatste wordt vrijgezet van haptocorrine in het duodenum door inwerking van onder andere trypsine (35). Het gevormde intrinsieke factor-vitamine B<sub>12</sub> complex wordt vervolgens opgenomen in de enterocyten ter hoogte van het ileum, waarna vitamine B<sub>12</sub> naar het bloed getransporteerd wordt en bindt aan het transportproteïne transcobalamine II. Door de binding van dit complex aan receptoren op de doelwitcellen kan vitamine B<sub>12</sub> tot slot worden opgenomen en zijn functie uitoefenen. Een frequente oorzaak van vitamine B<sub>12</sub>-deficiëntie is dan ook auto-immune gastritis, een aandoening die gekenmerkt wordt door de aanwezigheid van antistoffen gericht tegen de pariëtale cellen van de maag die intrinsieke factor produceren of tegen intrinsieke factor zelf. Deze welbepaalde vorm van anemie wordt pernicioze anemie genoemd. Daarnaast zijn absorptiestoornissen een frequente oorzaak van vitamine B<sub>12</sub>-deficiëntie.

Aangezien beide vitaminen een rol spelen in de DNA-synthese, geeft een tekort aanleiding tot een verstoorde celdeling en -replicatie en bijgevolg maturatiestoornissen van de erytrocyt, met name nucleocytoplasmatische dysmaturatie (16,32). Bovendien kan intramedullaire hemolyse optreden. De diagnose kan gesteld worden door de aanwezigheid van een macrocytaire, hyperchrome anemie, frequent geassocieerd met een leuko- en trombopenie in combinatie met een gedaald vitamine B<sub>12</sub>- en/of foliumzuurgehalte. Bovendien kunnen indirect bilirubine en lactaat dehydrogenase (LDH) gestegen zijn door de intramedullaire hemolyse. Dit laatste is eveneens het geval bij pernicioze anemie, waarbij omwille van de auto-immune aard bovendien antistoffen tegen de pariëtale cellen en/of intrinsieke factor teruggevonden kunnen worden. Daarnaast kunnen bij pernicioze anemie het homocysteïne- en methylmalonzuurgehalte in het serum en in de urine gestegen zijn en kennen ook de leukocyten megaloblastische afwijkingen.

Symptomen zijn oorzakelijk en kunnen gepaard gaan met onder andere mucosa- en haarwortelbeschadiging. In ernstigere gevallen kunnen zich mentale stoornissen voordoen. Bij pernicioze anemie en anemie door een vitamine B<sub>12</sub>-deficiëntie zijn neurologische symptomen zoals proprioceptiestoornissen en spierzwakte mogelijk. De behandeling is steeds oorzakelijk en kan aangevuld worden met vitamine B<sub>12</sub>- en/of foliumzuursuppletie *per os*. Opnieuw kan in uitzonderlijke gevallen een intraveneuze behandeling noodzakelijk zijn.

### 1.2.3 Anemie door chronische ziekte of infectie

Chronische ziekten of infecties kunnen via verscheidene mechanismen aanleiding geven tot anemie, onder andere via de vrijgave van pro-inflammatoire cytokines zoals interleukine-6 (16,31). Deze cytokines verhogen de hepcidine-expressie, wat aanleiding geeft tot de afbraak van ferroportine en bijgevolg een verminderde opname en beschikbaarheid van ijzer, een verminderde vrijgave van ijzer uit het reticulo-endotheliaal systeem en een toename van ijzer in de macrofagen. Bovendien kan chronische inflammatie zorgen voor een verminderde expressie van ferroportine (36,37). Desalniettemin hebben deze patiënten een normale ijzervoorraad. Chronische aandoeningen die aanleiding kunnen geven tot anemie omvatten chronische lever- en nieraandoeningen, endocrinologische aandoeningen, hartfalen, obesitas ...

De laboratoriumdiagnose van anemie door chronische ziekte (ACZ) of infectie berust op de aanwezigheid van een doorgaans normocytair, normochrome anemie in combinatie met een gestegen CRP-gehalte of gestegen bezinkingssnelheid van erythrocyten (BSE). Bovendien is bij deze patiënten het serumijzergehalte verlaagd, het FER-gehalte normaal of (vals) verhoogd (positief acute fase eiwit) en het TRF-gehalte normaal of (vals) verlaagd (negatief acute fase eiwit). In tabel 1 kan een overzicht teruggevonden worden van de ijzerparameters bij FA en/of ACZ (38).

Tabel 1: Overzicht van ijzerparameters bij FA en ACZ (38).

Parameter	FA	ACZ	FA + ACZ
Serumijzer	Gedaald	Normaal of gedaald	Gedaald
TRF	Gestegen	Normaal of gedaald	Normaal
FER	Gedaald	Normaal of gestegen	Normaal
TRF-/ijzersaturatie	Gedaald	Normaal of gedaald	Normaal of gedaald
Beenmergijzer	Verminderd tot afwezig	Aanwezig	Verminderd tot afwezig

De behandeling van ACZ is in eerste instantie causaal en symptomatisch en kan indien nodig aangevuld worden door bloedtransfusies.

#### 1.2.4 Hemoglobinopathie

##### 1.2.4.1 Hemoglobinevarianten

Hb-varianten komen tot stand door een puntmutatie in het  $\beta$ -globinegen waardoor een abnormaal globine-eiwit tot expressie komt (6,19). Bijgevolg wordt er nog Hb geproduceerd, zij het in een afwijkende vorm, en is er een bijkomende piek te zien aan de hand van *high-performance liquid chromatography* (HPLC) of via (capillaire) elektroforese. De aanwezigheid van een variant wordt naderhand bevestigd met behulp een tweede analysemethode die verschilt van de eerste. HbS (Afrika) is bij uitstek de meest voorkomende variant, naast HbC (West-Afrika), HbD (India) en HbE (Indonesië) (39,40). Bovendien zijn combinaties van Hb-varianten en thalassemieën mogelijk.

Sikkelcellen ontstaan door de neerslag van HbS bij homozygote HbS-patiënten (sikkelcelziekte) bij temperatuurverhoging, in een zuur milieu of bij een gedaalde zuurstofspanning, wat aanleiding geeft tot een verstoorde bloedstroom en een verhoogde bloedaafbraak. Deze sikkelcellen kunnen microscopisch waargenomen worden in een perifere bloeditstrijkje, evenals de aanwezigheid van *target cells*, *Howell-Jolly bodies*, *Pappenheimer bodies* en basofiele stippeling. In combinatie met de aanwezigheid van een extra piek aan de hand van HPLC of via (capillaire) elektroforese en de aanwezigheid van een (microcytaire), hypochrome anemie geven deze bevindingen aanleiding tot de laboratoriumdiagnose van sikkelcelanemie (16). Deze analyses kunnen eventueel aangevuld worden door de sikkeltest, dewelke echter steeds minder routinematig wordt uitgevoerd.

Hoewel heterozygote HbS-patiënten (*sikkelcel trait*) geen symptomen vertonen, worden homozygoten, patiënten met een combinatie van HbS en  $\beta$ -thalassemie en patiënten met HbSC voornamelijk getroffen door vaso-occlusieve pijn crisis. Bovendien kunnen sekwestratiecrisis (milt, long) en cerebrovasculaire complicaties optreden. De therapie bestaat dan ook voornamelijk uit het voorkomen van sikkelcelcrisis, dewelke behandeld dienen te worden aan de hand van hydratatie en adequate pijnstilling, al dan niet aangevuld door bloedtransfusies in ernstige gevallen.

##### 1.2.4.2 Thalassemie

Thalassemieën, dewelke zich voornamelijk rond het Middellandse Zeegebied situeren, zijn autosomaal recessieve aandoeningen die tot stand komen door een mutatie in één van de vier  $\alpha$ -globulinegenen ( $\alpha$ -thalassemie, deleties en puntmutaties) of één van de twee  $\beta$ -globulinegenen ( $\beta$ -thalassemie, puntmutaties) (41,42). Als gevolg wordt een normaal globine-eiwit geproduceerd, echter met een gewijzigde expressie. Bijgevolg wordt er geen extra piek waargenomen aan de hand van HPLC of (capillaire) elektroforese, waardoor de diagnose gesteld dient te worden met behulp van moleculaire testen. Door de gewijzigde expressie wordt de ratio tussen  $\alpha$ - en  $\beta$ -globulinen verstoord, wat aanleiding geeft tot een neerslag van de overmaat aan ongebonden globuline. Als gevolg treedt een verstoorde maturatie van erythrocyten, een verstoorde erythropoëse en anemie op.

De diagnose wordt gesteld op basis van de aanwezigheid van een microcytaire, hypochrome anemie in combinatie met typische hemolyseparameters, namelijk een gestegen reticulocytenaantal (RET-aantal), gedaald haptoglobine, gestegen indirect bilirubine en gestegen LDH (16). Bovendien kunnen het ijzer- en FER-gehalte gestegen zijn. Bij microscopisch nazicht van een perifere bloeditstrijkje kunnen *Pappenheimer bodies*, traancellen en *target cells* waargenomen worden. In het geval van een  $\alpha$ -thalassemie is het Hb<sub>A2</sub>-gehalte soms gedaald, terwijl dit bij patiënten met  $\beta$ -thalassemie quasi steeds gestegen is. Een definitieve diagnose kan gesteld worden met behulp van moleculaire onderzoeken.

Naargelang het type thalassemie kunnen symptomen variëren in ernst. Zo wordt  $\beta$ -thalassemie major, een homozygote vorm, doorgaans voor de leeftijd van één jaar gediagnosticeerd in het kader van een transfusieafhankelijke anemie. Bovendien kan de extramedullaire aanmaak van erythrocyten leiden tot skeletafwijkingen en kunnen veelvuldige bloedtransfusies aanleiding geven tot ijzerbelasting. Bijgevolg dienen deze patiënten steeds chelatietherapie te ontvangen en kan enkel een allogene stamceltransplantatie definitieve genezing bieden, alhoewel er eveneens onderzoek wordt gedaan naar gentherapie.

In tegenstelling tot patiënten met  $\beta$ -thalassemie major vertonen patiënten met  $\beta$ -thalassemie intermedia, dewelke over één of twee abnormale  $\beta$ -genen beschikken, minder ernstige symptomen en hebben deze een opmerkelijk lagere transfusienood, alhoewel ijzerchelatie ook bij deze patiënten onontbeerlijk blijft (43).

Tot slot vertonen patiënten met een heterozygote vorm ( $\beta$ -thalassemie minor,  *$\beta$ -thalassemia trait*) geen symptomen. Het onderscheid tussen *thalassemia trait* en FA kan gemaakt worden aan de hand van de Mentzer index, dewelke de verhouding tussen het MCV en de RBC weergeeft (44,45). Een waarde kleiner dan 13 geeft aan dat *thalassemia trait* de meest waarschijnlijke onderliggende oorzaak is, terwijl een waarde groter dan 13 wijst op een onderliggende FA.

Patiënten met een  $\alpha$ -thalassemie ondervinden doorgaans minder ernstige symptomen dan patiënten met een  $\beta$ -thalassemie. Zo zijn patiënten met één afwijkend  $\alpha$ -globulinegenen ( $-\alpha/\alpha$ ) asymptomatisch en wordt deze afwijking doorgaans per toeval vastgesteld in het kader van een microcytair hypochroom bloedbeeld, al dan niet in combinatie met een zeer milde anemie. Patiënten met twee functionele  $\alpha$ -genen ( $-\alpha/-\alpha$  of  $--/\alpha$ ) hebben daarentegen last van een milde microcytaire anemie, terwijl patiënten met HbH ( $--/-\alpha$ ) matige hemolytische anemie vertonen, eventueel in aanwezigheid van een splenomegalie. Tot slot zijn neonaten met Hb Barts hydrops foetalis ( $--/--$ ) niet levensvatbaar omwille van de afwezigheid van de  $\alpha$ -globulinegensynthese.

### 1.2.5 Sideroblastische anemie

Sideroblastische anemie kan zowel aangeboren als verworven zijn en wordt veroorzaakt door een inadequate inbouw van ijzer in het Hb van erythroblasten bij een normale ijzervoorraad, wat aanleiding geeft tot een verminderde Hb-synthese met anemie als gevolg. Bovendien draagt de snellere afbraak van erythrocyten ten gevolge van hun verhoogde fragiliteit bij tot het ontstaan van de anemie. Daarenboven neemt het lichaam omwille van deze anemie compensatoir meer ijzer op, wat in combinatie met de normale ijzervoorraad aanleiding geeft tot secundaire hemochromatose met orgaanschade als resultaat.

De diagnose wordt gesteld op basis van een microcytaire, hypochrome anemie met de aanwezigheid van typische morfologische afwijkingen zoals basofiele stippeling, *Pappenheimer bodies*, anulocten en *target cells* in het perifere bloed in combinatie met het vaststellen van ringsideroblasten in het beenmerg, dewelke ontstaan door een pathologische verzadiging van de mitochondriën met ijzer. Bovendien kunnen moleculaire onderzoeken de diagnose ondersteunen in het geval van aangeboren sideroblastische anemieën.

### 1.2.6 Beenmergaandoeningen

Verscheidene beenmergpathologieën kunnen aanleiding geven tot anemie, waaronder acute leukemie, myelodysplastische syndromen (MDS), chronische myeloïde leukemie (CML) (22) ...

Acute myeloïde leukemie (AML) en acute lymfoïde leukemie (ALL) zijn aandoeningen die respectievelijk voornamelijk volwassenen en kinderen treffen en gekenmerkt worden door een abnormale proliferatie van myeloblasten en lymfoblasten die slechts beperkt differentiëren, wat aanleiding geeft tot een gestegen aantal myeloblasten of lymfoblasten in het beenmerg en/of perifere bloed. Aangezien de myeloïde (AML) of lymfoïde (ALL) reeks het beenmerg overheerst, worden de erytroïde en megakaryocytaire reeks onderdrukt en kan er bijgevolg in het perifere bloed doorgaans een leukocytose waargenomen worden (uitzondering: aleukemische leukemie) in combinatie met een normochrome, normocytaire anemie en trombopenie. De laboratoriumdiagnose wordt gesteld met behulp van een beenmergpunctie waarop een hypercellulair beenmerg met minstens 20 % blasten te zien is en wordt aangevuld met immuunfenotypering.

MDS is een verworven hematologische maligniteit die voornamelijk ouderen treft en zijn oorsprong kent in de myeloïde stamcel. Omwille van een ineffektieve hematopoëse ontstaan er, ondanks een gestegen productie van cellen, cytopenieën ten gevolge van een versnelde en verhoogde apoptose. Bijgevolg berust de laboratoriumdiagnose typisch op het vaststellen van een celrijk beenmerg in combinatie met een (macrocytaire) anemie en eventuele trombopenie en neutropenie, na het uitsluiten van niet-klonale oorzaken. Daarnaast kunnen één of meerdere mergreeksen in verschillende mate dysplastische kenmerken vertonen, zoals bijvoorbeeld losse kernlobben (megakaryocytaire reeks), hypogranulatie (myeloïde reeks) of deshemoglobinisatie (erytroïde reeks).

CML is een verworven klonale aandoening die hoofdzakelijk voorkomt bij volwassenen en veroorzaakt wordt door een ongecontroleerde proliferatie van de multipotente hematopoëtische stamcel met een nagenoeg normale differentiatie. Deze ongecontroleerde proliferatie wordt in 90 % van de gevallen veroorzaakt door een translocatie tussen chromosoom 9 en chromosoom 22, dewelke aanleiding geeft tot de vorming van het BCR-ABL-fusiegen (Philadelphia-chromosoom, uitzondering: atypische CML). Dit doet op zijn beurt de expressie van tyrosine kinase,



een enzym met een rol in de celdeling, toenemen, wat leidt tot een ongecontroleerde celdeling. De klassieke behandeling met tyrosine kinase-inhibitoren zoals imatinib kent hier dan ook zijn aangrijpingspunt. De diagnose wordt niet sporadisch toevallig gesteld tijdens de chronische fase en is gebaseerd op het vaststellen van een hypercellulair beenmerg in combinatie met een milde anemie en perifere leukocytose met basofilie en/of eosinofilie zonder morfologische afwijkingen. Bij microscopisch nazicht van het perifere bloeduitstrijkje kunnen myeloïde cellen van alle differentiëstadiëën teruggevonden worden.

Tot slot kan het beenmerg ingenomen worden door niet-hematologische tumoren.

### *1.2.7 Anemie door nieraandoeningen*

De productie van het erythropoësestimulerend hormoon EPO door de nier is afhankelijk van de zuurstofverzadiging van het bloed. Bijgevolg kunnen longproblemen omwille van hun invloed op het zuurstofgehalte en nierproblemen omwille van hun rol in de productie van EPO aanleiding geven tot anemie.

Aan de hand van laboratoriumonderzoeken kan bij deze patiënten een normocytaire, normochrome anemie met een gedaald aantal RET vastgesteld worden in combinatie met een gedaald EPO-gehalte en een verminderde nierfunctie (eGFR < 60 mL/min/1.73m<sup>2</sup>, creatinine > 1.10 mg/dL (man) of > 0.80 mg/dL (vrouw)). Naarmate de nierfunctie verder afneemt, neemt de ernst van de anemie toe (47).

De behandeling bestaat uit de perorale toediening van ijzer en subcutane of intraveneuze injecties van biosynthetisch EPO.

### *1.2.8 Anemie door bloedverlies*

Anemie kan zich voordoen zonder onderliggende pathologische oorzaak, zoals dit bijvoorbeeld het geval is tijdens of na een operatie, bij een trauma of in de postpartumfase. De anemie wordt in deze situaties louter door een acuut verlies van RBC en bijgevolg van Hb veroorzaakt, wat weerspiegeld wordt in de aanwezigheid van normochrome, normocytaire RBC. Daartegenover staan echter anemieën door chronisch bloedverlies dewelke een onderliggende pathologische oorzaak hebben, zoals dit bijvoorbeeld het geval is bij gastro-intestinale bloedingen ten gevolge van diverticulose.

### *1.2.9 Aangeboren hemolytische anemie*

#### *1.2.9.1 Aangeboren membraanafwijkingen van de erythrocyt*

Hereditaire sferocytose is de meest prevalentie aangeboren membraanafwijking van de RBC en wordt autosomaal dominant overgeërfd. De typische sferocyten ontstaan door defecten van diverse membraanproteïnen, waaronder spectrine en ankyrine, waardoor onder andere de permeabiliteit van het membraan van de RBC wijzigt en hun osmotische fragiliteit toeneemt met hemolyse als gevolg.

Typische laboratoriumbevindingen zijn een macrocytaire anemie en een gestegen *mean corpuscular hemoglobin concentration* (MCHC) in combinatie met een gestegen reticulocytose omwille van de toegenomen activiteit van de erythropoëse en een gedaald haptoglobine-, gestegen indirecte bilirubine- en gestegen LDH-gehalte omwille van de hemolyse. Bovendien kunnen sferocyten waargenomen worden bij microscopisch nazicht van een perifere bloeduitstrijkje. Gezien het congenitale karakter van de aandoening wordt de diagnose hoofdzakelijk gesteld bij zuigelingen en jonge kinderen.

De symptomen variëren naargelang de ernst van de anemie en omvatten onder andere deze van splenomegalie en icterus. Bovendien kunnen er zich hemolytische crisissen voordoen, dewelke uitgelokt worden door externe factoren zoals bijvoorbeeld infecties. De behandeling bestaat uit een splenectomie, wat enkel aangewezen is bij symptomatische patiënten waarbij de diagnose reeds op jonge leeftijd gesteld werd.

#### *1.2.9.2 Aangeboren enzymafwijkingen van de erythrocyt*

Glucose-6-fosfaat dehydrogenase (G6PD) is een voorbeeld van een enzym dat betrokken is in de productie van nicotinamide adenine dinucleotide fosfaat (NADPH) en speelt bijgevolg een rol in de bescherming van de RBC tegen oxidatieve stress. Een deficiëntie, die omwille van de X-gebonden aard van de aandoening uitsluitend mannen treft, kan daarom in situaties van oxidatieve stress, bijvoorbeeld door infecties, aanleiding geven tot acute intravasculaire hemolyse met hemoglobulinurie. Naar aanleiding van deze hemolyse kunnen opnieuw de typische hemolyseparameters en gestegen reticulocytose vastgesteld worden in combinatie met een macrocytaire anemie.

#### *1.2.9.3 Congenitale dyserythropoëtische anemie*

Congenitale dyserythropoëtische anemie (CDA) is een verzamelnaam voor zeldzame aandoeningen die aanleiding geven tot een ineffektieve erythropoëse, waardoor een monolineaire cytopenie ontstaat. De verschillende vormen kunnen teruggevonden worden in tabel A1 (zie *Appendices*) (48,49,50).

Bij patiënten met CDA kunnen typische morfologische afwijkingen van de erythroïde reeks vastgesteld worden, zoals bijvoorbeeld de aanwezigheid van multinucleaire erytroblasten en kern- en cytoplasmabruggen tussen erytroblasten. De laboratoriumdiagnose berust op het vaststellen van een normo- of macrocytaire, milde tot ernstige, chronische anemie, gecombineerd met de typische hemolyseparameters in het geval van CDA type II, III en IV en wordt aangevuld met genetische onderzoeken. Aangezien deze aandoeningen gekenmerkt worden door een ineffektieve erythropoëse, kan er geen gestegen aantal RET waargenomen worden.

De behandeling bestaat uit het toepassen van transfusies indien patiënten getroffen worden door ernstige anemie, wat eventueel aangevuld kan worden met ijzerchelatietherapie omwille van het risico op ijzerstapeling. Patiënten met CDA type I kunnen bovendien behandeld worden met interferon  $\alpha$ . Een hematopoëtische stamceltransplantatie blijft tot op heden de enige curatieve behandeling.

### *1.2.10 Verworven hemolytische anemie*

#### *1.2.10.1 Paroxysmale nachtelijke hemoglobinurie*

Paroxysmale nachtelijke hemoglobinurie (PNH), waarvan de prevalentie op 16 per miljoen wordt geschat, wordt gekenmerkt door een verworven mutatie in het *PIG-A*-gen van de hematopoëtische stamcel (16,51,52). Omwille van de rol van het overeenkomstige eiwit in de synthese van glycosylfosfatidylinositol (GPI) zorgt deze mutatie voor een verstoorde binding van complement-inhiberende oppervlakte-eiwitten aan het plasmamembraan van de RBC, wat aanleiding geeft tot een gebrek aan CD55 en CD59 (53). Als gevolg kennen deze RBC een verhoogde gevoeligheid voor complementfactoren, waardoor intravasculaire hemolyse kan optreden. De afwezigheid van CD55 en CD59 kan opgespoord worden aan de hand van immunofenotypering, wat de vroeger gebruikte Hamstest vervangt, en maakt bovendien een onderscheid mogelijk tussen type I, type II en type III (respectievelijk normale, partiële deficiëntie en volledige deficiëntie van GPI). Omwille van hun normale levensduur, in tegenstelling tot de RBC, wordt bovendien de expressie van CD24 en fluorescent aerolysine (FLAER) bepaald op granulocyten (CD15<sup>++</sup>, CD33<sup>+</sup>) en de expressie van CD14 en FLAER op de monocytten (CD15<sup>+</sup>, CD33<sup>++</sup>), wat het risico op een onderschatting van de kloon reduceert. Het perifeer bloedbeeld wordt gekenmerkt door een lichte tot matige, macrocytarie anemie, al dan niet met aanwezigheid van traandruppelcellen bij microscopisch nazicht. Daarnaast is er omwille van de toegenomen erythropoëtische activiteit ten gevolge van de hemolyse sprake van een reticulocytose, stijging van het indirect bilirubine- en LDH-gehalte en een daling van het haptoglobinegehalte.

Symptomen omvatten deze van anemie, pulmonale hypertensie, chronische nierinsufficiëntie (CNI), hemolyse, hemoglobinurie en trombose, dewelke zich onder andere manifesteren als dyspnoe en abdominale pijn. De behandeling is in eerste instantie supportief (bijvoorbeeld RBC-transfusies en foliumzuursupplementen) en kan aangevuld worden met eculizumab, een monokonaal antilichaam gericht tegen complementfactor 5. Omwille van het risico op trombose kan antistolling aangewezen zijn. Een definitieve genezing kan enkel bereikt worden door middel van een allogene stamceltransplantatie.

#### *1.2.10.2 Mechanische hemolyse*

Onder invloed van mechanische krachten kunnen RBC beschadigd raken, waardoor fragmentocyten ontstaan en er intravasale hemolyse optreedt. Enkele voorbeelden van dergelijke situaties zijn het kapotslaan van RBC bij het sluiten van kunstmatige hartkleppen en het pletten van RBC bij langdurige inspanningen zoals het lopen van marathons (*march* hemoglobinurie). In het perifeer bloeduitstrijkje kunnen bij microscopisch nazicht de typische fragmentocyten waargenomen worden. Tot slot kaderen een macrocytaire anemie, hemoglobinemie, hemoglobinurie, verminderde nierfunctie, reticulocytose, gestegen indirect bilirubine- en LDH-gehalte en een gedaald haptoglobinegehalte binnen deze mechanische hemolyse.

#### *1.2.10.3 Microangiopathische hemolytische syndromen*

Microangiopathische hemolyse kan veroorzaakt worden door intravasale stolling waarbij er een netwerk van fibrinedraden wordt gevormd waar RBC door worden geperst en waardoor bijgevolg fragmentocyten ontstaan. Een typevoorbeeld van microangiopathische hemolyse is primaire trombotische trombocytopenische purpura (TTP), dewelke veroorzaakt wordt door een ADAMTS13-deficiëntie, hetzij omwille van een mutatie in het gen dat codeert voor ADAMTS13, hetzij door de vorming van auto-antistoffen tegen ADAMTS13 (meest voorkomend). ADAMTS13 staat in voor het splitsen van de von Willebrandfactor (vWF), een stollingseiwit dan aanwezig is ter hoogte van het endotheel in de bloedvaten. Door deze splitsing kunnen bloedplaatjes (BP) in fysiologische omstandigheden niet binden aan vWF. Bij een tekort aan ADAMTS13 stapelen de BP zich echter op ter hoogte van vWF, waardoor er grote complexen gevormd worden die aanleiding geven tot plaatjesactivatie, microtrombi, intravasculaire hemolyse, diepe trombopenie en een fragmentatie van RBC bij hun passage langs dergelijke complexen. Bijgevolg ontstaat er een macrocytaire anemie en trombopenie (echter met trombose) met aanwezigheid van fragmentocyten in het perifeer bloeduitstrijkje. Bovendien zijn omwille van de Coombs-negatieve hemolyse het RET-aantal, indirect bilirubine- en LDH-gehalte gestegen en is het haptoglobinegehalte gedaald. Daarnaast is het creatininegehalte normaal of licht gestegen en bedraagt de ADAMTS13-activiteit van minder dan 10 %.

De **PLASMIC**-score kan gebruikt worden om het risico op een ADAMTS13-activiteit van minder dan 10 % op te sporen en omvat de volgende criteria (54,55):

- BP minder dan  $30 \times 10^9/L$  (“*platelets*”);
- Evidentie voor hemolyse (“*lysis*”): RET-aantal groter dan 2.5 %, indirect bilirubine meer dan 2.5 g/dL, ondetecteerbaar haptoglobine;
- Geen actieve maligniteit (“*active cancer*”);
- Geen vast orgaantransplant of stamceltransplant (“*stem cell or solid organ transplant*”);
- **M**CV kleiner dan 90 fL;
- **I**nternational Normalized Ratio (INR): kleiner dan 1.5;
- **C**reatinine kleiner dan 2.0 mg/dL.

Bij elk criterium dat van toepassing is wordt 1 punt toegekend. Een score van 6-7/7, 5/7 en 0-4/7 wijzen op een hoge, intermediaire en lage waarschijnlijkheid voor een ADAMTS13-activiteit van minder dan 10 %, respectievelijk.

Symptomen omvatten onder andere vermoeidheid, nausea en braken, hoofdpijn en in zeldzame gevallen pijn op de borst. De behandeling bestaat uit een plasmaferese waarbij de anti-ADAMTS13-antistoffen vervangen worden. Deze plasmaferese kan eventueel aangevuld worden door de toediening van corticosteroiden of anti-aggregantia.

#### *1.2.10.4 Hemolyse door chemische of fysische factoren*

Voorbeelden van situaties waarin chemische stoffen aanleiding geven tot hemolyse zijn intoxicaties met lood, methemoglobinevorming door nitrieten, insecten- of spinnenbeten ... Enkele fysische factoren die daarentegen hemolyse kunnen veroorzaken zijn warmte, bijvoorbeeld zoals dit het geval is bij brandwonden, of hyperbare zuurstof, bijvoorbeeld bij de toediening van 100 % zuurstof. Opnieuw kunnen hier de typische hemolyseparameters, zijnde een reticulocytose, gestegen indirect bilirubine- en LDH-gehalte en een gedaald haptoglobinegehalte vastgesteld worden in combinatie met een anemie. De behandeling van hemolyse door chemische of fysische factoren is oorzakelijk.

#### *1.2.10.5 Hemolyse door infectieuze agentia*

Een voorbeeld van hemolyse door infectieuze agentia is hemolyse door de intra-erythrocytaire groei van malariaparasieten. Omwille van de aanwezigheid van de parasiet in de RBC neemt diens osmotische fragiliteit toe, waarna hemolyse optreedt, zowel intravasculair als ter hoogte van de milt (met als gevolg splenomegalie). Ook in dit geval kunnen naast een anemie de typische hemolyseparameters opgespoord worden (zie eerder), wat wordt aangevuld door een detectie van de parasiet. Het spreekt voor zich dat de behandeling van hemolyse door infectieuze agentia oorzakelijk is. Voorbeelden van andere infectieuze agentia die hemolyse kunnen veroorzaken zijn *Clostridium perfringens* of *Bartonella* species.

#### *1.2.10.6 Immuungemedieerde hemolytische anemie*

Een onderscheid tussen immuungemedieerde hemolytische anemieën wordt gemaakt op basis van het betrokken antilichaam (allo- of auto-immuun, warme of koude autoantilichamen), de onderliggende oorzaak (idiopathische auto-immune of secundaire immuunhemolytische anemie) en de intra- of extravasculaire lokalisatie. Opnieuw kunnen hier de eerder aangehaalde hemolyseparameters teruggevonden worden, evenals een positieve directe Coombsreactie in het geval van auto-immune hemolytische anemie door warme- of koudetypeantilichamen. Bovendien kunnen bij microscopisch nazicht van het perifeer bloeditstrijkje sferocyten waargenomen worden, wat al dan niet wordt vergezeld door een leuko-erythroblastaire formule.

#### *1.2.10.7 Hypersplenisme*

Aangezien erythrocyten hoofdzakelijk afgebroken worden ter hoogte van de milt, leidt een hyperactieve milt tot een toegenomen afbraak van onder andere erythrocyten met anemie als gevolg, al dan niet in combinatie met een leuko- en/of trombopenie, waardoor de hematopoëse ter hoogte van het beenmerg gestimuleerd wordt. Hypersplenisme kan aanleiding geven tot splenomegalie en treedt in de meeste gevallen secundair aan andere aandoeningen op, bijvoorbeeld ten gevolge van een lymfoom, bij infectieuze aandoeningen zoals malaria of leveraandoeningen, waardoor de behandeling in eerste instantie oorzakelijk is. De diagnose wordt gesteld op basis van de aanwezigheid van een normo- tot macrocytaire anemie met toegenomen reticulocytose, al dan niet in combinatie met een splenomegalie dewelke aangetoond wordt met behulp van beeldvormende onderzoeken.

### 1.3 Parameters gebruikt bij de exploratie van anemie

Zoals reeds eerder werd aangehaald verschillen de Hb-concentraties naargelang de leeftijd, het geslacht en de fysiologische status (21). Bijgevolg variëren ook de voorgestelde *cut-offs* voor de opsporing van anemie. Een overzicht van referentiewaarden voor de Hb-concentratie wordt weergegeven in tabel A2 (zie *Appendices*) (56,57,58,59,60).

Na het vaststellen van een anemie aan de hand van de Hb-concentratie dient de onderliggende oorzaak geëxploreerd te worden. Teneinde deze te achterhalen dienen bijkomende analyses uitgevoerd te worden (61,62). Een niet-limitatieve lijst van oorzaken van micro-, normo- en macrocytaire anemie is terug te vinden in tabel 2, alsook aangewezen bijkomende testen (61). Referentiewaarden van bijkomende parameters kunnen teruggevonden worden in tabel A3 (zie *Appendices*) (59). Voor een verdere uitwerking wordt verwezen naar 2.1 *Protocollen*.

Tabel 2: Oorzaken van micro-, normo- en macrocytaire anemie (61).

Classificatie	MCV (fL)	Oorzaken	Aanvullende test
Microcytair	<84 (M), <83 (V)	Ijzerdeficiëntie	Ijzer, ijzersaturatie, FER, TRF
		Thalassemie	Elektroforese, HPLC, DNA-onderzoek
		Sideroblastische anemie	-
		Anemie door inflammatie	EPO, FER
Normocytair	84-96 (M), 83-99 (V)	Anemie door inflammatie	EPO, FER
		Hemolyse of bloedverlies	Haptoglobine, LDH, indirect bilirubine, RET-aantal
		Nierziekten	Creatinine, EPO
Macrocytair	>96 (M), >99 (V)	Vitamine B <sub>12</sub> - of foliumzuurdeficiëntie	Vitamine B <sub>12</sub> , foliumzuur
		MDS	Beenmergonderzoek
		Chemotherapie, aplastische anemie, hypothyroidie, lever- en nierziekten	-

#### 1.3.1 Klassieke parameters

Tegenwoordig wordt een hematologische analyse van een bloedstaal uitgevoerd aan de hand van geautomatiseerde toestellen dewelke via flowcytometrie een celtelling van de RBC, witte bloedcellen (WBC) en BP uitvoeren en bovendien toelaten om de WBC te differentiëren en erythrocytenindices te bepalen (63). Deze toestellen bepalen rechtstreeks de Hb-concentratie en het MCV en berekenen het hematocriet (RBC/MCV), MCH (Hb/RBC), MCHC (Hb/hematocriet) en de *red cell distribution width* (RDW), dewelke een maat is voor de anisocytose.

De **Hb-concentratie** wordt op de hedendaagse celtellers bepaald door in eerste instantie de RBC en WBC te lyseren, waarna de heemgroep van Hb geoxideerd wordt. Vervolgens binden de hydrofiele groepen van cyanidevrij natriumlaurylsulfaat, het reagens waarvan deze analyzer gebruik maakt, aan deze geoxideerde heemgroep, waardoor een stabiel en gekleurd complex wordt gevormd dat fotometrisch geanalyseerd kan worden. Mogelijke interferenties die leiden tot vals verhoogde waarden zijn te wijten aan een verhoogde troebelheid van het staal dewelke interfereert met de fotometrische bepaling, zoals dit bijvoorbeeld het geval is bij een hoge leukocytose, icterie of lipemie. Aangezien er bij de berekening van het MCH en MCHC gebruik wordt gemaakt van de Hb-concentratie, zullen deze parameters in dergelijke gevallen eveneens een vals verhoogde waarde kennen, waardoor het aantal RBC en hematocriet betrouwbaarder zijn in deze situaties.

Historisch gezien wordt een anemie ingedeeld op basis van de morfologie van de RBC en dus het **MCV** of het gemiddelde volume van de RBC. Via elektrische impedantie wordt het volume van de RBC gemeten, waarna deze waarden uitgezet worden in een histogram aan de hand waarvan het gemiddelde volume berekend kan worden. Vals verlaagde waarden kunnen veroorzaakt worden door de aanwezigheid van fragmentocyten, reuzebloedplaatjes of BP-aggregaten, terwijl vals verhoogde waarden te wijten kunnen zijn agglutinatie. Hoewel een anemie doorgaans geclassificeerd wordt op basis van het MCV, is dit mogelijks misleidend, daar een (beginnende) FA of anemie door foliumzuur- of vitamine B<sub>12</sub>-deficiëntie normocytair kan zijn. Bovendien kan de combinatie van co-existerende aandoeningen, zoals bijvoorbeeld een foliumzuur- met ijzerdeficiëntie, leiden tot een normaal gemiddeld volume van de RBC en dus normocytair anemie.

Het **MCH** is de gemiddelde hoeveelheid Hb per RBC en wordt zoals eerder aangehaald niet gemeten maar berekend door de Hb-concentratie te delen door het aantal RBC. Aangezien de bepaling van Hb beïnvloed kan worden door een hoge leukocytose, icterie of lipemie, is het MCH hier eveneens onderhevig aan. Bovendien kunnen vals verhoogde waarden voorkomen ten gevolge van de aanwezigheid van hemoglobinoopathiën, vergoederd leverlijden en paraproteïnes. Vals verlaagde waarden kunnen daarentegen veroorzaakt worden door overmatig alcoholgebruik.

Het **MCHC** is de gemiddelde Hb-concentratie per RBC en wordt eveneens berekend door de Hb-concentratie te delen door het hematocriet. Opnieuw kunnen vals verhoogde waarden voorkomen in het geval van een hoge leukocytose, icterie of lipemie, de aanwezigheid van hemoglobinoopathiën, vergevorderd leverlijden en paraproteïnes, maar ook door hyponatriëmie of de aanwezigheid van koude agglutinenen. MCHC-waarden kunnen daarentegen effectief verhoogd zijn door sferocytose, terwijl verlaagde waarden kunnen veroorzaakt worden door onder andere FA.

De **RDW** wordt eveneens berekend door de standaarddeviatie van het histogram van het RBC-volume te delen door het MCV en meet de spreiding in het volume van de RBC of anisocytose. De referentiewaarden zijn leeftijds- en geslachtsafhankelijk.

Aangezien FA de meest voorkomende vorm van anemie is, is inzicht in de bepaling van ijzerparameters van belang. Voor de bepaling van het **serumijzergehalte** wordt veneus bloed 's morgens in nuchtere toestand afgenomen, aangezien de ijzerconcentratie dan het hoogst is. Doordat deze een circadiaanse variatie kent, kan een afname op een ander tijdstip aanleiding geven tot een concentratieverschil dat kan oplopen tot 30 %. Bovendien varieert de concentratie naargelang de inname van voeding. De analyse gebeurt colorimetrisch en kan beïnvloed worden door hemolyse, dewelke leidt tot vals verhoogde waarden. Effectief verhoogde waarden komen onder andere voor bij ijzersuppletie (peroraal, parenteraal), hemochromatose of transfusiepatiënten, terwijl verlaagde waarden te wijten kunnen zijn aan een ijzertekort, inflammatie, bloedverlies en chronische nieraandoeningen.

**FER** doet dienst als opslagewit voor ijzer, waardoor de FER-concentratie, dewelke immunologisch bepaald wordt, een goede maat is voor de ijzerreserves. Enkele nadelen van deze bepaling zijn de sterk verschillende referentiewaarden naargelang de analysemethode en het ontbreken van een internationale standaard. Bovendien interfereren verhoogde (in)directe bilirubineniveaus, hemolyse en hypertriglyceridemie met de analyse. Verhoogde waarden komen onder andere voor bij inflammatie, ijzerstapelingsziekten, *in vivo* hemolyse en hepatische cytolyse, terwijl ijzerdeficiëntie typisch leidt tot een gedaalde FER-concentratie.

Voor de bepaling van **TRF**, dewelke eveneens op een immunologische analyse berust, vindt een bloedafname idealiter 's morgens plaats in nuchtere toestand. Gedaalde concentraties worden onder andere veroorzaakt door inflammatie omwille van zijn rol als negatief acute fase eiwit, malnutritie en ijzerstapeling, terwijl de concentratie toeneemt bij ijzertekort en verhoogde oestrogeenconcentraties.

De **TRF-saturatie** is een maat voor de gemiddelde bezetting van de bindingssites van TRF met ijzer, wat minder gevoelig is voor inflammatie en gevoeliger is voor ijzeroverbelasting. Aangezien het serumijzergehalte een circadiaanse variatie kent en onderhevig is aan de inname van voeding, is dit tevens het geval voor de TRF-saturatie. Verhoogde waarden worden veroorzaakt door ijzerstapeling, terwijl gedaalde waarden te wijten zijn aan ijzertekort.

De concentratie van de **oplosbare TRF-receptor (sTfR)**, dewelke ook immunologisch bepaald wordt, is een maat voor de hoeveelheid weefsel die deze receptor tot expressie brengt. Enkele aanzienlijke voordelen ten opzichte van andere ijzerparameters is dat deze niet onderhevig is aan inflammatie of varieert naargelang het geslacht en dat gestegen waarden reeds vroeg vastgesteld kunnen worden bij een negatieve ijzerbalans. Een nadeel is daarentegen de sterke variatie in referentiewaarden naargelang de analysemethode en een gebrek aan standaardisatie. Stijgingen van de concentratie aan sTfR kunnen worden waargenomen bij een ijzerdeficiëntie of toegenomen erytropoëse, zoals dit het geval is bij onder andere hemolytische anemie en MDS. Gedaalde concentraties komen daarentegen voor bij ijzeroverbelasting en een verminderde erytropoëse, bijvoorbeeld bij aplastische anemie.

**Hepcidine** wordt voornamelijk bepaald in het kader van hereditaire hemochromatose en FA die niet beantwoordt aan perorale ijzersuppletie. De bloedafname gebeurt opnieuw idealiter 's morgens in nuchtere toestand omwille van een circadiaanse variatie, waarna het monster op een immunologische wijze of via massaspectrometrie geanalyseerd wordt. Enkele nadelen zijn het verschillen van referentiewaarden naargelang de analysemethode en een gebrek aan standaardisatie, maar ook kruisreactiviteit in het geval van de immunologische bepaling. Toegenomen waarden komen voor bij inflammatie, ijzeroverbelasting, hereditaire hemochromatose type IV en FA die niet beantwoordt aan perorale ijzersuppletie, terwijl gedaalde waarden veroorzaakt worden ten gevolge van ijzerdeficiëntie, hemolyse, hypoxie, toediening van erytropoëse-stimulerende medicatie of hereditaire hemochromatose (type I, IIa, IIb, III).

Een tweede frequente oorzaak van anemie is vitamine B<sub>12</sub>- of foliumzuurdeficiëntie, dewelke eerder werden bepaald via radio-immuno assays.

Op heden gebeurt het bepalen van de **vitamine B<sub>12</sub>**-concentratie via een immunologische dosering met directe chemiluminescentie, waarbij referentiewaarden afhankelijk zijn van de toegepaste analysemethode. Mogelijke interferenties zijn bilirubineconcentraties boven 20 mg/dL, hemolyse, hypertriglyceridemie en de aanwezigheid van fluoride of ascorbinezuur. Bovendien kan de inname van metformine aanleiding geven tot een gedaalde vitamine B<sub>12</sub>-concentratie en kent deze een sterke intra-individuele variatie.

Een analyse van het **foliumzuurgehalte** gebeurt eveneens immunologisch via elektrochemiluminescentie, bij voorkeur na een bloedafname in nuchtere toestand omwille van de invloed van inname via de voeding. Mogelijke interferenties omvatten opnieuw bilirubineconcentraties boven 20 mg/dL en hypertriglyceridemie.

Zoals eerder reeds werd vermeld, wordt ACZ vastgesteld op basis van de aanwezigheid van een normocyttaire, normochrome anemie in combinatie met een gestegen CRP-gehalte of gestegen BSE.

**CRP** is een positief acute fase eiwit dewelke een rol speelt in de opsonisatie door adhesie aan fagocyterende cellen en in de activatie van het complementsysteem. De CRP-concentratie neemt binnen de 6 tot 10 uren toe (tot 1 000x) bij inflammatie, infecties, trauma, weefschade, tumoren en auto-immuunaandoeningen en normaliseert snel wanneer de onderliggende oorzaak verdwijnt omwille van zijn korte halfwaardetijd ( $t_{1/2} = 24$  uren). Hoewel dit een sensitieve parameter betreft, is deze niet specifiek. Bovendien kent deze een relatief grote intra-individuele variabiliteit. De bepaling van de CRP-concentratie gebeurt turbidimetrisch en wordt beïnvloed door hemolyse, lipemie en gammopathie.

De **BSE** is een sensitieve, niet-specifieke merker die bepaald wordt door fotometrisch de sedimentatiesnelheid van RBC op te volgen, dewelke beïnvloed wordt door de aanwezigheid van acute fase eiwitten en immunoglobulines. Referentiewaarden zijn leeftijd- en geslachtsafhankelijk en verscheidene condities kunnen de waarde beïnvloeden. Zo geven onder andere anemie, macrocytose, hypercholesterolemie, een te hoge omgevingstemperatuur en hypoalbuminemie aanleiding tot vals gestegen waarden, terwijl onder andere polycythemie, microcytose, de aanwezigheid van sikkelcellen of sferocyten, hypogammaglobulinemie, hypofibrinogenemie en extreme leukocytose aanleiding geven tot vals gedaalde waarden.

Aangezien BSE meer onderhevig is aan patiënt-specifieke factoren dan CRP en deze parameter bovendien pas na enkele dagen begint te stijgen, heeft de bepaling van BSE weinig toegevoegde waarde ten opzichte van deze van CRP (64). Uitzonderingen hierop zijn de diagnose of *follow-up* van reumatologische aandoeningen, osteo-articulaire infecties, osteomyelitis en de ziekte van Hodgkin.

Anemie door nierziekten wordt daarentegen gekenmerkt door de aanwezigheid van een normocyttaire, normochrome anemie in combinatie met een gedaald aantal RET, een gedaald EPO-gehalte en een verminderde nierfunctie.

**Creatinine** is een molecule met een constante productie naargelang de spiermassa en een vrije filtratie ter hoogte van de nier zonder reabsorptie met beperkte tubulaire secretie (7 % - 10 %), waardoor dit een goede indicator is voor de nierfunctie. Serumwaarden zijn afhankelijk van de leeftijd, het geslacht en de spiermassa. De bepaling ervan in het serum gebeurt via enzymatische colorimetrie en wordt beïnvloed door hemolyse, lipemie en bepaalde geneesmiddelen (bijvoorbeeld dobutamine, cefoxitine). Gedaalde waarden komen onder andere voor in het geval van cachexie, spierziekten, vergevorderde leverziekten, amputaties en zwangerschap, terwijl verhoogde waarden waargenomen kunnen worden bij patiënten met een verminderde nierfunctie, na de inname van een vleesrijke maaltijd of na inspanning.

De inschatting van de **GFR** berust op een berekening, waarvoor er verschillende formules beschikbaar zijn en waarvan de meest gebruikte de *Modification of Diet in Renal Diseases Study Group* (MDRD)-formule en de *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI)-formule zijn. Deze houden beiden rekening met het serum creatininegehalte, de leeftijd, het geslacht en de etniciteit van de patiënt. De laatste vertoont overigens minder bias, kent een betere precisie, werd – in tegenstelling tot de MDRD-formule (18 – 70 jaar) – ook gevalideerd bij bejaarden en is accurater voor de inschatting van de GFR bij waarden tussen de 60 en 90 mL/min. Aangezien de berekening van de eGFR onder andere op basis van het serum creatininegehalte gebeurt, is de eGFR onderhevig aan dezelfde interferenties als creatinine. Tot slot zijn andere formules beschikbaar voor de inschatting van de GFR bij kinderen, zoals bijvoorbeeld de Lund-Malmö vergelijking.

**EPO** is een hormoon dat door de nier geproduceerd wordt en bepaald wordt aan de hand van chemiluminescentie. Mogelijke interferenties bij deze bepaling zijn hemolyse, lipemie of de inname van biotine. Verhoogde EPO-concentraties komen voor bij anemie, terwijl verlaagde waarden het gevolg kunnen zijn van een verminderde nierfunctie of polycythemia vera.

Daarnaast kan anemie ontstaan ten gevolge van hemolyse, waarvan een gedaald haptoglobine, gestegen indirect bilirubine en gestegen LDH karakteristieke laboratoriumparameters zijn.

**Haptoglobine** is een eiwit dat vrij Hb bindt, waarna dit complex door het reticulo-endotheliaal stelsel uit de circulatie verwijderd wordt. Verlaagde waarden komen dan ook voor bij intravasale hemolyse, inefficiënte erythropoëse, RBC-beschadiging, ernstig leverfalen of ondervoeding. Aangezien haptoglobine een positief acute fase eiwit is, kan de combinatie van hemolyse en een acute fase reactie aanleiding geven tot een normaal resultaat, waardoor een gelijktijdige bepaling van het CRP-gehalte steeds aangewezen is. De analyse van haptoglobine gebeurt immunoturbidimetrisch en wordt beïnvloed door lipemische en troebele monsters.

De hoeveelheid **indirect bilirubine** wordt afgeleid uit de analyse van totaal en direct bilirubine, wat colorimetrisch bepaald wordt na omzetting tot een diazoniumverbinding. Interferenties kunnen veroorzaakt worden door hemolytische en lipemische stalen en gammopathie. Bovendien kan langdurige blootstelling van het staal aan licht leiden tot (vals) verlaagde waarden.

Tot slot is **LDH** een enzym dat de omzetting van lactaat tot pyruvaat katalyseert en voorkomt in het cytoplasma van nagenoeg alle cellen. Bijgevolg dient een LDH-bepaling, dewelke fotometrisch gebeurt, in het kader van hemolyse steeds in combinatie met andere testen uitgevoerd te worden, aangezien een gestegen waarde verscheidene oorzaken kan hebben. Enkele voorbeelden van aandoeningen die aanleiding geven tot een LDH-stijging zijn een myocardinfarct, acute virale hepatitis, hemolyse en nierziekten. Mogelijke interferenties van de analyse omvatten hemolytische en lipemische stalen en gammopathie. Bovendien kan de lekkage uit RBC bij laattijdige centrifuge aanleiding geven tot vals verhoogde LDH-concentraties, wat men op het spoor kan komen door eveneens verlaagde glucosewaarden vast te stellen.

Tot slot kunnen met de huidige celltellers eveneens het absolute of relatieve aantal **RET** bepaald worden, wat onrijpe erythrocyten zijn dewelke RNA bevatten (22). Ze komen gedurende drie dagen voor in het beenmerg, waarna ze slechts één tot twee dagen circuleren in het perifere bloed alvorens ze hoofdzakelijk ter hoogte van de milt van hun RNA worden ontdaan en ze verder evolueren tot rijpe erythrocyten. Normaalwaarden variëren van 0.5 % tot 1.5 % bij volwassenen en van 2 % tot 6 % bij neonaten, waarbij hun aantal een indicator is van de activiteit van het beenmerg (65). Hierbij geniet hun absolute concentratie steeds de voorkeur boven hun relatieve concentratie, omdat deze respectievelijk informatie geven over de erytropoëtische capaciteit van het beenmerg en hun levensduur. Aangezien het aantal RET bij regeneratie van de erytropoëse binnen twee tot drie dagen toeneemt, bijvoorbeeld na de start van ijzersuppletie bij FA, kan het al dan niet aanslaan van een behandeling om anemie te corrigeren beduidend sneller beoordeeld worden aan de hand van het RET-aantal dan wanneer het erythrocytenaantal, dewelke een levensduur van 120 dagen hebben, bepaald wordt.

### 1.3.2 Nieuwere parameters

RET-gebaseerde parameters omvatten het RET Hb-gehalte (RET-He), de RET productie index (RPI), de immature RET-fractie (IRF) en delta-Hb (Delta-He) dewelke allen parameters zijn van de Sysmex XN analyzers die in het RET-kanaal geanalyseerd worden (65,66).

Het **RET-He** is een weerspiegeling van de Hb-synthese in de precursoren ter hoogte van het beenmerg. Deze parameter kan daarom gebruikt worden als een maat voor de ijzerbeschikbaarheid en heeft bijgevolg een aanvullende waarde bij de klassieke ijzerparameters zoals FER en TRF. Hoewel voordelen ten opzichte van deze laatste de eenvoudige analyse, de korte analysetijd en de lagere analysekosten zijn, is er geen gestandaardiseerde *cut-off* beschikbaar voor RET-He. Het RET-He kan eveneens bepaald worden op de ADVIA analyzers van Siemens, waar het onder de parameter 'CHR' gerapporteerd wordt.

Daarnaast laat de **RPI** toe om de effectiviteit van de erytropoëse te beoordelen: een waarde hoger dan 3 % bij een anemische patiënt wijst op een adequate aanmaak van erythrocyten en suggereert een perifere oorzaak van anemie, bijvoorbeeld bloedverlies. Een waarde lager dan 2 % bij een anemische patiënt wijst daarentegen op een verminderde erytropoëse, dewelke te wijten kan zijn aan nutritionele deficiënties, chronische ziektes of primaire beenmergaandoeningen. Wanneer er bovendien binnen twee tot drie dagen na acuut bloedverlies geen stijging in RET waargenomen kan worden, kan men een ineffektieve erytropoëse besluiten.

De **IRF** omvat semi- en immature RET met respectievelijk een medium en grote hoeveelheid RNA en wordt gebruikt voor het vroegtijdig evalueren van de regeneratie van de erytropoëse. Normale waarden schommelen rond de 5 %, alhoewel referentie-intervallen variëren naargelang de gebruikte methode (67). De IRF stijgt reeds na enkele uren na het opstarten van een effectieve behandeling om een anemie te corrigeren, terwijl deze tijdsspanne voor de RET twee tot drie dagen bedraagt. Het uitblijven van een stijging wijst dan ook op het falen van de therapie. Tot slot geeft **Delta-He** het verschil weer tussen het Hb-equivalent van RET en dat van erythrocyten. Wanneer een FA bijgevolg behandeld wordt met peroraal of intraveneus (IV) ijzer, zal dit aanleiding geven tot een positief verschil. Een negatief verschil kan daarentegen veroorzaakt worden door inflammatie.

Een voordeel van RET-gerelateerde parameters is dat deze, met uitzondering van Delta-He en in tegenstelling tot FER en TRF, niet onderhevig zijn aan inflammatie. Bovendien geven ze nagenoeg *real-time* informatie over de erytropoëse. Een nadeel is echter dat klinici minder of niet vertrouwd zijn met deze parameters. Dit kan echter opgelost worden door deze louter te gebruiken voor de uitwerking van de anemie en deze bijgevolg niet te rapporteren naar de kliniek.

Enkele andere nieuwere, niet-RET-gebaseerde parameters zijn het percentage of aantal hypochrome RBC (Hypo-He) en het percentage microcytaire RBC (MicroR), dewelke tevens met de Sysmex XN analyzers bepaald kunnen worden.

**Hypo-He** wordt eveneens in het RET-kanaal geanalyseerd en wordt afgeleid van het Hb-gehalte van mature RBC. Het geeft het percentage of aantal RBC weer met een Hb-gehalte lager dan 17 pg per RBC. Aangezien een verhoogde omgevingstemperatuur en verlengde bewaartijd aanleiding kunnen geven tot een swelling van erythrocyten, neemt de verhouding tussen de hoeveelheid Hb en het volume van de cel in dergelijke situaties af en neemt het percentage Hypo-He bijgevolg toe. Bovendien zijn referentie-intervallen methodeafhankelijk, wat de vergelijkbaarheid belemmert.

Indien een patiënt zowel lijdt aan FA als aan anemie door foliumzuur- of vitamine B<sub>12</sub>-deficiëntie, kan het MCV binnen de referentiewaarden vallen doordat de micro- en macrocytaire RBC elkaar uitbalanceren. In dergelijke

gevallen kan een bepaling van het percentage **MicroR** een meerwaarde bieden. Dit percentage wordt bepaald door in het histogram dat de grootte van de RBC weergeeft alle RBC onder een welbepaalde *cut-off* als microcytair te classificeren. Ook hier kunnen, net zoals dit het geval is voor het MCV, fragmentocyten, reuzebloedplaatjes of BP interfereren met de analyse.

## 2. Resultaten en discussie

### 2.1 Protocollen

**Een eerste standaardprotocol** wordt aangeboden door het Nederlands Huisartsen Genootschap (NHG), wat teruggevonden kan worden in figuur 2 (zie *Appendices*) (68,69). Via dit protocol wordt in eerste instantie de Hb-concentratie nagegaan, waarna in een volgende fase eveneens het MCV en FER-gehalte worden bepaald en bijkomende testen toelaten om de onderliggende oorzaak van de anemie te identificeren. Hoewel dit protocol gebaseerd is op parameters die beschikbaar zijn op routineanalyzers en het in theorie dus relatief eenvoudig geïmplementeerd kan worden, werd het niet in de praktijk afgetoetst alvorens het publiceren ervan. Daarom vergeleken Oosterhuis *et al.* het originele NHG-protocol met een **tweede alternatief protocol**, wat teruggevonden kan worden in figuur 3 (zie *Appendices*) (69). Aan de hand van het alternatieve protocol wordt vooreerst een bepaling van het Hb-gehalte, het MCV, het aantal WBC, BP en RET uitgevoerd. Vervolgens wordt in een tweede fase in het geval van een gedaalde Hb-concentratie het FER-gehalte bepaald, waarna in het geval van een normale of verhoogde waarde bijkomende testen worden uitgevoerd in een derde fase.

Om het NHG-protocol en dat van Oosterhuis *et al.* met elkaar te kunnen vergelijken, werden resultaten van laboratoriumanalyses van 124 patiënten aan de hand van beide protocollen geïnterpreteerd. Hoewel er met behulp van beide protocollen bij 31 % van de patiënten FA werd vastgesteld, kon bij 0 % en 10 % van de patiënten anemie door vitamine B<sub>12</sub>- of foliumzuurdeficiëntie vastgesteld worden met het eerste en tweede protocol, respectievelijk. Een mogelijke verklaring voor het verschil tussen de resultaten van beide protocollen is dat een (beginnende) anemie door foliumzuur- of vitamine B<sub>12</sub>-deficiëntie, evenals een combinatie van beiden, (nog) normocytair kan zijn, waardoor een classificatie van de anemie op basis van het MCV, zoals dit het geval is in het eerste protocol, ervoor zorgt dat deze onderliggende oorzaak gemist wordt. Anemie door hemolyse en ACZ werden daarentegen in 0,8 % en 12 % van de gevallen vastgesteld met behulp van het NHG-protocol, terwijl dit 2 % en 5,6 % bedroeg met het alternatieve protocol, respectievelijk, waarbij verschillen te verklaren zijn door de verschillende definities voor hemolyse en ACZ. Tot slot werd met behulp van het eerste en tweede protocol bij 0 % en 2 % van de patiënten een onderliggende beenmergaandoening mogelijk geacht, respectievelijk, terwijl de anemie bij 4 % en 0,8 % van de patiënten veroorzaakt kon worden door een hemoglobinopathie, respectievelijk.

Het protocol van Oosterhuis *et al.*, dat zich echter baseert op een *single center* observatie, liet toe om bij 71 % van de patiënten de onderliggende oorzaak van de anemie vast te stellen, terwijl dit aan de hand van het NHG-protocol slechts 48 % betrof. Bovendien kon met behulp van het tweede protocol een combinatie van oorzaken opgespoord worden, wat niet het geval was met het NHG-protocol. Hoewel het protocol van Oosterhuis *et al.* dit toelaat, impliceert dit ook dat er in de derde fase meerdere analyses uitgevoerd dienen te worden die mogelijks overbodig zijn om de uiteindelijke oorzaak op te sporen. Tot slot wees hun onderzoek uit dat er in 23 % van de gevallen sprake was van anemie door nierziekten, een conditie die niet werd opgenomen in het originele NHG-protocol. Derhalve onderging deze laatste enkele wijzigingen, wat aanleiding gaf tot **een derde protocol** dat teruggevonden kunnen worden in figuur 4 (zie *Appendices*) (68).

Aangezien FER en TRF respectievelijk positieve en negatieve acute-fase eiwitten zijn, wordt in beide protocollen terecht gebruik gemaakt van een inflammatieparameter, met name de BSE. Deze is echter onderhevig aan patiënt-specifieke factoren, waaronder de leeftijd, het geslacht en geneesmiddelengebruik. Bovendien stijgt deze slechts na 24 tot 48 uren, terwijl het CRP-gehalte reeds na 4 tot 6 uren toeneemt. Bijgevolg wordt deze laatste verkozen boven BSE als inflammatieparameter (64,70).

**Een vierde protocol** waarin gebruik gemaakt wordt van CRP in plaats van BSE voor de uitwerking van anemie is dat uit de CAT van Stockman *et al.*, wat teruggevonden kan worden in figuur 5 en eveneens gepubliceerd werd in het Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde (zie *Appendices*) (71). Het protocol, dat echter niet in de praktijk werd afgetoetst, is gebaseerd op aanbevelingen uit de literatuur en is gericht op de behandeling van preoperatieve anemie, eerder dan op de automatisatie en standaardisatie van de uitwerking ervan. In het protocol worden de resultaten van het MCV en ijzerparameters, zijnde FER en TRF-saturatie, maar ook die van nieuwere parameters, namelijk Hypo-He, RET-He en RPI, met elkaar gecombineerd. Hierbij is het belangrijk om te vermelden dat Hypo-He, waarvan de waarde in normale omstandigheden minder dan 5 % bedraagt, net zoals het MCV beïnvloed wordt door bewaarcondities, wat aanleiding kan geven tot een vals verhoogd percentage Hypo-He (67). Daarnaast kan er opgemerkt worden dat er binnen het protocol terecht geen bepaling van serumijzer wordt uitgevoerd, in tegenstelling tot deze van het NHG en Oosterhuis *et al.* (68,69). Deze parameter is namelijk eveneens onderhevig aan inflammatie, maar varieert ook naargelang de inname via de voeding, chronische aandoeningen en veroudering (38,72). Bovendien kent het serumijzergehalte een circadianse variatie, waardoor een correcte opvolging enkel kan gebeuren indien de bloedafname steeds op hetzelfde moment werd uitgevoerd, bij voorkeur nuchter in de ochtend (63). De combinatie van deze factoren beperkt zijn diagnostische waarde bij de uitwerking van anemie.



**Een vijfde protocol** dat hoofdzakelijk uitgaat van nieuwere parameters in plaats van de eerder klassieke parameters is dat van Buttarello, wat teruggevonden kan worden in figuren 6, 7 en 8 (zie *Appendices*) (67). Na het vaststellen van een micro-, normo- of macrocytaire anemie wordt het aantal RET bepaald, in tegenstelling tot de voorgaande protocollen waar de bepaling van het FER-gehalte centraal staat. Vervolgens laten aanvullende testen toe om de onderliggende oorzaak op te sporen. Aangezien deze parameters niet beïnvloed worden door inflammatie, dient er in eerste instantie geen bepaling van het CRP-gehalte uitgevoerd te worden. Desalniettemin geeft het protocol aan om bij de uitwerking van een microcytaire anemie het FER- en TRF-gehalte te bepalen, dewelke onderhevig zijn aan inflammatie en waarbij de bepaling van een inflammatieparameter bijgevolg cruciaal is. Bovendien werden deze protocollen niet in de praktijk geëvalueerd en eindigen deze niet steeds met een enkelvoudige oorzaak als conclusie, wat een gerichte therapie belemmert. Daarnaast zou een bepaling van het aantal WBC en BP een meerwaarde zijn, aangezien deze de waarschijnlijkheid van beenmergfalen mee kunnen ondersteunen of ontkrachten (68,69,71). Ook vereisen de protocollen omtrent normo- en macrocytaire anemie de microscopische beoordeling van een perifere bloeduitstrijkje, wat de analysetijd verlengt en een manuele beoordeling impliceert, dewelke een grotere foutenmarge kent dan automatische analyses.

Greenberg *et al.* en Bisbe *et al.* ontwikkelden respectievelijk **een zesde en zevende protocol** met bijhorende *evidence-based* klinische richtlijnen gebaseerd op aanbevelingen uit de literatuur waarbij de bepaling van het Hb- en FER-gehalte opnieuw centraal staat (3,4). Aangezien FA de meest voorkomende vorm van anemie is, zijn de protocollen, dewelke echter niet werden afgetoetst in de praktijk en teruggevonden kunnen worden in figuren 9 en 10 (zie *Appendices*), er voornamelijk op gericht om dit op te sporen en vervolgens te behandelen. Het protocol van Greenberg *et al.* start met de bepaling van de CBC en het FER-gehalte bij patiënten die majeure chirurgie zullen ondergaan, met uitzondering van patiënten met CNI en het gebruik van erytropoëse-stimulerende agentia. Het protocol van Bisbe *et al.* vult dit aan met een bepaling van het CRP-, vitamine B<sub>12</sub>-, foliumzuurgehalte en de eGFR. In tegenstelling tot het protocol van Bisbe *et al.*, waarin een tijdsbestek van 30 dagen wordt gesuggereerd, wordt in dat van Greenberg *et al.* geen tijdstip van analyse gespecificeerd. Het is echter belangrijk om deze analyse niet te vroeg in te plannen, aangezien de patiënt later alsnog een anemie kan ontwikkelen. De analyse dient evenmin te dicht bij de geplande operatie uitgevoerd te worden, aangezien dit een effectieve interventie bemoeilijkt. Een voordeel van het protocol van Greenberg *et al.* is dat de bepaling van het CRP-gehalte en de TRF-saturatie slechts wordt uitgevoerd wanneer dit aangewezen is, namelijk om een acute-fase respons dewelke een onderliggende ijzerdeficiëntie kan maskeren uit te sluiten wanneer het FER-gehalte varieert tussen 30 en 100 ng/mL. Dit zorgt ervoor dat het onnodig uitvoeren van analyses vermeden wordt. Volgens het protocol van Bisbe *et al.* dient daarentegen een bepaling van het vitamine B<sub>12</sub>-, foliumzuurgehalte en de eGFR uitgevoerd te worden, alhoewel hier verder in het protocol niet meer op teruggekomen wordt en er bijgevolg eveneens geen vitaminesuppletie wordt aanbevolen. Beide protocollen bevelen logischerwijs aan om IV dan wel peroraal ijzer toe te dienen bij anemische patiënten met een FER-gehalte lager dan 30 ng/mL of tussen 30 en 100 ng/mL in het geval van een gestegen CRP. Daar waar het protocol van Bisbe *et al.* de keuze tussen toedieningsvormen overlaat aan de deskundigheid van de arts, wordt in het protocol van Greenberg *et al.* een voorstel qua toedieningsvorm gedaan op basis van de tijd alvorens de operatie plaatsvindt, de tolerantie van de patiënt voor orale toedieningsvormen en het Hb-gehalte. **Een achtste protocol** dat nagenoeg een combinatie is van deze van Greenberg *et al.* en Bisbe *et al.* is dat van Munting *et al.*, wat teruggevonden kan worden in figuur 11 (zie *Appendices*) (73).

Aangezien ijzerdeficiëntie de belangrijkste oorzaak is van anemie, is de opsporing en behandeling ervan van primordiaal belang. Hoewel dit eenvoudig vastgesteld kan worden aan de hand van een gedaalde Hb-concentratie, MCV en ijzerparameters, is het vaststellen van subklinische ijzerdeficiëntie of vroegtijdige, normocytaire FA minder evident. Bovendien is het onderscheid met ACZ niet altijd vanzelfsprekend, des te meer omdat beide aandoeningen simultaan kunnen voorkomen. Naar aanleiding van deze bevindingen werd de Thomas plot ontwikkeld, dewelke toelaat om via een combinatie van parameters een onderscheid te maken tussen FA, ACZ en de combinatie van beiden en waarvan **het negende protocol** teruggevonden kan worden in figuren 12 en 13 (zie *Appendices*) (74). Op de x-as van de plot wordt de verhouding tussen de concentratie van de sTfR en de logaritme van de FER-concentratie weergegeven, wat een maat is voor het ijzeraanbod voor de erytropoëse. Op de y-as wordt het CHR-gehalte weergegeven, wat een maat is voor functioneel ijzertekort.

De sTfR is een monomeer afkomstig van de TRF-receptor die aanwezig is op alle ijzer-behoevende cellen (75). Wanneer het ijzer-TRF-complex bindt aan deze receptor, wordt het geheel geïnternaliseerd via endosomen en wordt ijzer uiteindelijk vrijgezet in het cytoplasma van de cel. Aan de hand van proteolytische splitsing van de receptor wordt deze van zijn extracellulair domein ontdaan, waarna sTfR circuleert in het bloed. De sTfR is bijgevolg een maat voor de totale TRF-receptorconcentratie en is sensitieve parameter voor de weerspiegeling van de ijzerstatus van de patiënt, aangezien ijzerdeficiëntie een overexpressie van de TRF-receptor en bijgevolg van de sTfR induceert en *vice versa*. In tegenstelling tot FER en TRF is sTfR niet onderhevig aan inflammatie. Voor een uitleg over het CHR-gehalte wordt verwezen naar de paragraaf over RET-He (zie 1.3.2 *Nieuwere parameters*).

Het onderzoek van Thomas *et al.* toonde aan dat de verhouding tussen de sTfR en de logaritme van FER de meest accurate was voor het vaststellen van functionele ijzerdeficiëntie (75). De *cut-off* voor de verhouding tussen de sTfR en de logaritme van FER is onafhankelijk van het geslacht en werd vastgelegd op 1.5 en 0.8 bij patiënten met een CRP lager of gelijk aan 5 mg/L en hoger dan 5 mg/L, respectievelijk. De *cut-off* voor functionele ijzerdeficiëntie

op basis van CHr, dewelke werd bepaald door resultaten van 71 niet-anemische patiënten te gebruiken voor het opstellen van referentie-intervallen, werd vastgelegd op een waarde van 28 pg. Een latere studie van Thomas *et al.* toonde overigens aan dat CHr uit de originele plot zonder verlies van sensitiviteit of specificiteit vervangen kan worden door RET-He en dat beide parameters bijgevolg diagnostisch equivalent zijn (76). Aan de hand van deze *cut-offs* deelden Thomas *et al.* de plot op in vier kwadranten, waarvan toelichting teruggevonden kan worden in figuren 12 en 13 (zie *Appendices*).

Aangezien patiënten uit kwadranten twee en drie een verminderde ijzervoorraad hebben, dienen deze perorale ijzersuppletie te krijgen. Wanneer dit wordt toegepast en de behandeling effectief is, kan een verschuiving worden gezien van patiënten uit kwadrant drie naar kwadrant twee binnen tien dagen en van kwadrant twee naar kwadrant één binnen vier tot zes weken. Kwadrant vier omvat patiënten met functionele ijzerdeficiëntie, dewelke bijgevolg best een combinatietherapie krijgen van IV ijzer en recombinant humaan erytropoëetine (rHuEPO). Daar patiënten met  $\beta$ -thalassemia *trait* zich eveneens binnen kwadrant vier bevinden, wordt steeds aanbevolen om in dit geval de verhouding tussen het percentage microcytaire en Hypo-He te bepalen, waarvan de waarden gegenereerd worden door de celteller van Sysmex. Bij thalassemie is het aantal microcyten namelijk groter dan het aantal Hypo-He, in tegenstelling tot FA, waardoor een verhouding groter dan 0.9 is suggestief voor  $\beta$ -thalassemia *trait* (67).

Een retrospectieve studie van Enko *et al.* waarbij patiënten die electieve chirurgie ondergingen in het kader van een totale heup- of knieprothese werden onderverdeeld in een groep waarbij de Thomas plot zowel diagnostisch als therapeutisch niet en wel werd toegepast, toonde aan dat bij deze laatste de perioperatieve Hb-concentratie toenam en de nood voor perioperatieve RBC-transfusies afnam (77).

Een andere studie van Leers *et al.* omvatte 337 volwassen anemische patiënten die door de huisarts werden doorverwezen (78). De CBC werd bepaald, evenals het serumijzer, TRF, FER, sTfR, creatinine, bilirubine, haptoglobine, LDH, CRP, BSE, vitamine B<sub>12</sub> en foliumzuur. Vervolgens werden de patiënten opgedeeld in twee groepen: 133 patiënten werden gebruikt om *cut-offs* te bepalen voor de Thomas plot, 204 patiënten werden gebruikt om de diagnostische waarde van de Thomas plot te toetsen. De *cut-offs* uit het onderzoek van Leers *et al.* waren licht verschillend ten opzichte van deze uit de originele Thomas plot, aangezien er in de studie van Leers *et al.* gebruik werd gemaakt van een andere techniek en meetprincipe om het RET Hb-gehalte te bepalen (RET-He (Leers *et al.*) versus CHr (Thomas *et al.*)) en omwille van het niet maken van een onderscheid tussen patiënten met of zonder acute fasereactie in de studie van Leers *et al.* De resultaten van de eerder vernoemde bepalingen werden voor de eerste groep patiënten door twee personen onafhankelijk van elkaar beoordeeld en geïnterpreteerd, waarbij ze voor 80 % van de patiënten (107/133) tot eenzelfde conclusie kwamen en voor 32 % (42/133) geen oorzaak van de anemie konden aanduiden. In de tweede groep, waarbij gebruik werd gemaakt van de Thomas plot, bleef voor slechts 14 % (29/204) de oorzaak ongekend. Bij de 42 niet te classificeren patiënten uit groep I werd vervolgens alsnog de Thomas plot toegepast, aan de hand waarvan voor 20 patiënten alsnog een oorzaak geïdentificeerd kon worden. Beide studies benadrukten bijgevolg de diagnostische en therapeutische waarde van de Thomas plot, alsook zijn waarde in het opvolgen van de therapie.

Hoewel de Thomas plot bijgevolg toelaat om een onderscheid te maken tussen FA, ACZ en de combinatie ervan, het mogelijk maakt om latente FA op te sporen én ervoor zorgt dat de oorzaak in minder gevallen ongekend blijft, zijn er desalniettemin enkele nadelen aan verbonden. Zo is het bepalen van de sTfR relatief duur en tijdrovend, zijn klinici niet vertrouwd met de parameter en is er onvoldoende standaardisatie tussen verschillende *assays* voor bepaling ervan (78,79). Bovendien stijgt het sTfR-gehalte als respons op de proliferatie van precursoren van erythrocyten, zoals dit bijvoorbeeld het geval is tijdens de zwangerschap of bij hemolyse, waardoor patiënten uit kwadrant één verkeerdelijk in kwadrant twee terecht komen en het gebruik van de plot bijgevolg enkel geschikt is in hypo- en normoproliferatieve condities.

Naar aanleiding van deze vaststellingen werd door Castel *et al.* een alternatieve Thomas plot ontwikkeld en gevalideerd waarin de bepaling van sTfR werd vervangen door de analyse van TRF (80). **Dit tiende protocol**, wat teruggevonden kan worden in figuur 14 (zie *Appendices*), werd eveneens gevalideerd door de Leur *et al.* naar analogie met de methode van Leers *et al.* en werd vergeleken met de originele Thomas plot (78,81). Daarvoor bepaalden ze het Hb, MCV, RET-He, FER, TRF, serumijzer, sTfR, BSE, LDH, creatinine, transcobalamine, foliumzuur en de eGFR van 536 volwassenen patiënten met anemie. De resultaten van 188 patiënten werden gebruikt om *cut-offs* te bepalen voor RET-He (31.2 pg, sensitiviteit van 83 %, specificiteit van 63 %) en de verhouding van TRF (1.71, sensitiviteit van 95 %, specificiteit van 100 %) of sTfR (0.91, sensitiviteit van 94 %, specificiteit van 84 %) ten opzichte van de logaritme van FER. Het verschil in *cut-off* voor de verhouding van sTfR ten opzichte van de logaritme van FER in vergelijking met de originele Thomas plot en de studie van Leers *et al.* kan verklaard worden door het gebruik van een andere analysemethode, een andere matrix en de slechts gedeeltelijke standaardisatie van de sTfR-*assay*. Bij 348 patiënten werd de diagnostische waarde van de originele en alternatieve Thomas plot met elkaar vergeleken. Voor elke patiënt werd het type anemie bepaald door twee onafhankelijke klinisch biologen met behulp van het NHG-protocol, waarbij een derde klinisch bioloog geconsulteerd werd in het geval van een discrepantie (54). Hoewel er zonder het gebruik van de plots in 39 % (135/343) van de gevallen geen onderliggende oorzaak werd vastgesteld, daalde dit percentage naar 27 % (94/343 en 93/343) met zowel de originele als de alternatieve Thomas plot. Bovendien werden de patiënten nagenoeg op een identieke manier ingedeeld in de kwadranten aan de hand van de originele en alternatieve plot, met uitzondering van kwadranten drie (37 % versus 29 %, 37 % versus 29 %).

respectievelijk) en vier (9 % en 17 %, respectievelijk). De alternatieve Thomas plot is bijgevolg een valabele vervanging van de originele plot. Later werd eveneens een plot ontwikkeld waarbij de verhouding tussen sTfR ten opzichte van de logaritme van FER uit de originele Thomas plot werd vervangen door hepcidine-25 met een *cut-off* van 4 nmol/L (82). Hoewel hepcidine-25 toeliet om bij concentraties kleiner of gelijk aan 4 nmol/L een onderscheid te maken tussen FA en ACZ of FA/ACZ, kon er geen onderscheid gemaakt worden tussen ACZ en ACZ/FA. Dit laatste werd wel mogelijk wanneer de resultaten van hepcidine-25 gecombineerd werden met deze van RET-He en bleek zelfs superieur te zijn ten opzichte van de originele Thomas plot. Desondanks deze belovende resultaten beperken de complexiteit van de analyse, de kostprijs, de relatief lange analysetijd, de beperkte generaliseerbaarheid gezien het *single center* onderzoek en de beperkte standaardisatie de implementatie ervan in de praktijk.

Tot slot ontwikkelden Weimann *et al.* een elfde protocol genaamd de Hema-Plot, een diagnostische plot gebaseerd op RET-He als merker van functionele ijzerdeficiëntie en Delta-He als een merker van een verminderde hemoglobinisatie van RET als gevolg van een inflammatoir proces (83). Deze plot kan teruggevonden worden in figuur 15 (zie *Appendices*). Om deze te ontwerpen werden bij 345 patiënten onder andere de CBC, het RET-aantal en het CRP-gehalte bepaald, waarna een Mann-Whitney U Test werd uitgevoerd om statistisch significante verschillen tussen parameters van verschillende patiëntengroepen op te sporen. Zo bleek dat Delta-He verschilt tussen gezonde neonaten en gezonde volwassenen, in tegenstelling tot RET-He en CRP, en dat Delta-He een onderscheid kan maken tussen de combinatie van ACZ/FA versus FA. Bovendien werd er een verschil aangetoond tussen Delta-He, RET-He en CRP van patiënten met ACZ, de combinatie van ACZ/FA en sepsis die wel en geen therapie krijgen.

Enkele voordelen van de Hema-plot zijn de korte *turn-around time*, het feit dat de verschillende parameters 24/7 bepaald kunnen worden, de lage analysekost en de beperkte analyses die uitgevoerd dienen te worden, namelijk de CBC, het aantal RET, RET-He en Delta-He. Bovendien laat de plot toe om het effect van de therapie op te volgen. Een nadeel is het minder vertrouwde karakter van de nodige parameters ten opzichte van de conventionele parameters met betrekking tot anemiediagnostiek. Daarnaast werd deze plot na het opstellen ervan niet afgetoetst in de praktijk, noch door Weimann *et al.*, noch door andere onderzoeksgroepen, waardoor de generaliseerbaarheid van de resultaten uit de studie van Weimann *et al.* in vraag gesteld kan worden.

Een overzicht van de besproken protocollen met bijhorende voor- en nadelen kan teruggevonden worden in tabel 3. Voor informatie over voor- en nadelen van de gehanteerde parameters wordt verwezen naar 1.3.1 *Klassieke parameters* en 1.3.2 *Nieuwere parameters*.

Tabel 3: Overzicht van de besproken protocollen. (pre-op = preoperatief)

Protocol	Publicatie	Anemie	Parameters	Voordelen	Nadelen
1	Guideline	Algemeen	Hb, MCV, FER, serumijzer, TRF, BSE, RET, WBC, BP, LDH, vitamine B <sub>12</sub> , foliumzuur	<ul style="list-style-type: none"> <li>Gebaseerd op parameters beschikbaar op hedendaagse routineanalyzers</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Niet in praktijk afgetoetst</li> <li>Classificatie o.b.v. MCV</li> <li>Gebruik van BSE i.p.v. CRP</li> <li>Criteria voor hemolyse onvoldoende sensitief</li> <li>&gt; 50 % blijvende ongekende oorzaak</li> <li>Geen inclusie van anemie door nierziekten</li> <li>Weinig gedetailleerde uitwerking</li> <li>Combinatie van FA met ACZ ontbreekt</li> </ul>
2	Originele studie	Algemeen	Hb, MCV, WBP, BP, RET, FER, TRF, serumijzer, BSE, vitamine B <sub>12</sub> , foliumzuur, creatinine, haptoglobine, LDH	<ul style="list-style-type: none"> <li>Gebaseerd op parameters beschikbaar op hedendaagse routineanalyzers</li> <li>Vergeleken met het originele NHG-protocol en dus in praktijk afgetoetst</li> <li>Oorzaak geïdentificeerd bij 71 %</li> <li>Combinatie van oorzaken mogelijk</li> <li>Inclusie van anemie door nierziekten</li> <li>Geen classificatie o.b.v. MCV</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Single center observatie</li> <li>Meer analyses t.o.v. protocol 1 en dus hogere analysekost</li> <li>Gebruik van BSE i.p.v. CRP</li> <li>Geen specifieke cut-offs</li> <li>Combinatie van FA met ACZ ontbreekt</li> </ul>
3	Guideline	Algemeen	Hb, MCV, FER, vitamine B <sub>12</sub> , foliumzuur, LDH, RET, BSE, serumijzer, TRF, eGFR, WBC, BP, RBC, Hb-elektroforese/chromatografie	<ul style="list-style-type: none"> <li>Gebaseerd op parameters beschikbaar op hedendaagse routineanalyzers</li> <li>Inclusie van anemie door nierziekten</li> <li>Aangepaste criteria voor hemolyse</li> <li>In praktijk in gebruik in verschillende laboratoria</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Gebruik van BSE i.p.v. CRP</li> <li>Minder gefaseerd onderzoek</li> <li>Deels gebaseerd op MCV</li> <li>Combinatie van FA met ACZ ontbreekt</li> </ul>
4	Originele studie	Pre-op	CBC, RET, RET-He, RPI, Hypo-He, CRP, creatinine, FER, TRF-saturatie, vitamine B <sub>12</sub> , foliumzuur, bloedgroep, haptoglobine, LDH, indirect bilirubine	<ul style="list-style-type: none"> <li>Gebaseerd op parameters beschikbaar op hedendaagse routineanalyzers</li> <li>Real-time informatie door gebruik van RET-gebaseerde parameters</li> <li>Gebruik van CRP i.p.v. BSE</li> <li>Aanbevolen tijdstip voor analyse</li> <li>Geen bepaling van serumijzer</li> <li>Bevat behandelrichtlijnen</li> <li>Geen classificatie o.b.v. MCV</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Single center richtlijnen</li> <li>Geen vergelijking met andere protocollen</li> <li>Werd niet geëvalueerd in de praktijk</li> <li>Niet gefaseerd bij aanvang</li> <li>Combinatie van FA met ACZ ontbreekt</li> </ul>

Protocol	Publicatie	Anemie	Parameters	Voordelen	Nadelen
5	Originele studie	Algemeen	<p><u>5.1</u> MCV, RET, RET-He, RET-volume, % microcytaire RBC, % Hypo-He, serumijzer, FER, TRF-saturatie</p> <p><u>5.2</u> MCV, RET, haptoglobine, LDH, bilirubine, directe Coombs</p> <p><u>5.3</u> MCV, RET, IRF</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Real-time</i> informatie door gebruik van RET-gebaseerde parameters</li> <li>• Zeer gedetailleerde uitwerking</li> <li>• Zeer gefaseerd</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Single center</i> richtlijnen</li> <li>• Werd niet geëvalueerd in de praktijk</li> <li>• Geen vergelijking met andere protocollen</li> <li>• Classificatie o.b.v. MCV</li> <li>• Ontbreken van inflammatieparameter</li> <li>• Manuele microscopische beoordeling</li> <li>• Combinatie van FA met ACZ ontbreekt</li> </ul>
6	Originele studie	Pre-op	CBC, FER, CRP, TRF-saturatie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gebaseerd op parameters beschikbaar op hedendaagse routineanalyzers</li> <li>• Gefaseerd onderzoek</li> <li>• Bevat behandelrichtlijnen</li> <li>• Gebruik van CRP i.p.v. BSE</li> <li>• Gebaseerd op aanbevelingen uit de literatuur</li> <li>• Geen classificatie o.b.v. MCV</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Geen inclusie van anemie door nierziekten</li> <li>• Werd niet geëvalueerd in de praktijk</li> <li>• Geen vergelijking met andere protocollen</li> <li>• Voornamelijk focus op FA</li> <li>• <i>Single center</i> richtlijnen</li> <li>• Combinatie van FA met ACZ ontbreekt</li> </ul>
7	Originele studie	Pre-op	CBC, FER, CRP, vitamine B <sub>12</sub> , foliumzuur, eGFR	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gebaseerd op parameters beschikbaar op hedendaagse routineanalyzers</li> <li>• Aanbevolen tijdstip voor analyse</li> <li>• Bevat behandelrichtlijnen</li> <li>• Gebruik van CRP i.p.v. BSE</li> <li>• Gebaseerd op aanbevelingen uit de literatuur</li> <li>• Geen classificatie o.b.v. MCV</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Geen inclusie van anemie door nierziekten</li> <li>• Geen uitwerking van afwijkend vitamine B<sub>12</sub>-, foliumzuur-, of eGFR-resultaat</li> <li>• Voornamelijk focus op FA</li> <li>• Werd niet geëvalueerd in de praktijk</li> <li>• Geen vergelijking met andere protocollen</li> <li>• <i>Single center</i> richtlijnen</li> <li>• Combinatie van FA met ACZ ontbreekt</li> </ul>
8	Originele studie	Pre-op	Hb, FER, TRF-saturatie, vitamine B <sub>12</sub> , foliumzuur, CRP, creatinine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gebaseerd op parameters beschikbaar op hedendaagse routineanalyzers</li> <li>• Bevat behandelrichtlijnen</li> <li>• Gebruik van CRP i.p.v. BSE</li> <li>• Meer aandacht voor niet-FA t.o.v. protocollen 6 en 7</li> <li>• Gebaseerd op aanbevelingen uit de literatuur</li> <li>• Inclusie van anemie door nierziekten</li> <li>• Geen classificatie o.b.v. MCV</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Werd niet geëvalueerd in de praktijk</li> <li>• Geen vergelijking met andere protocollen</li> <li>• <i>Single center</i> richtlijnen</li> <li>• Combinatie van FA met ACZ ontbreekt</li> </ul>

Protocol	Publicatie	Anemie	Parameters	Voordelen	Nadelen
9	Originele studie	Algemeen	sTfR, FER, CHr	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Onderscheid mogelijk tussen FA, ACZ en de combinatie ervan</li> <li>• Opsporing van latente FA</li> <li>• Geëvalueerd in de praktijk</li> <li>• Diagnostische en therapeutische waarde, wat werd bevestigd door verschillende onderzoeksgroepen</li> <li>• sTfR = sensitief voor weerspiegeling ijzerstatus</li> <li>• Minder ongekeerde oorzaken</li> <li>• Geen classificatie o.b.v. MCV</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• sTfR: dure analyse, tijdrovend, onvoldoende standaardisatie, niet routinematig uitgevoerd, enkel geschikt voor gebruik bij hypo- en normoproliferatieve condities</li> <li>• Laat geen diagnose toe van niet-FA/-ACZ</li> </ul>
10	Originele studie	Algemeen	TRF, FER, RET-He	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Onderscheid mogelijk tussen FA en ACZ</li> <li>• Opsporing van latente FA</li> <li>• Gebaseerd op parameters beschikbaar op hedendaagse routineanalyzers</li> <li>• Geëvalueerd in de praktijk</li> <li>• Vergelijking met andere protocollen</li> <li>• Diagnostische en therapeutische waarde, wat werd bevestigd door verschillende onderzoeksgroepen</li> <li>• Minder ongekeerde oorzaken</li> <li>• Geen classificatie o.b.v. MCV</li> <li>• Ook bruikbaar bij hyperproliferatieve aandoeningen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Laat geen diagnose toe van niet-FA/-ACZ</li> <li>• Combinatie van FA met ACZ ontbreekt</li> </ul>
11	Originele studie	Algemeen	Delta-He, RET-He	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diagnostische en therapeutische waarde</li> <li>• Korte <i>turn-around time</i></li> <li>• Geen classificatie o.b.v. MCV</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Geen inclusie van anemie door nierziekten</li> <li>• Geen enkelvoudige oorzaak als resultaat, dus geen gerichte therapie</li> <li>• Minder beschreven in literatuur t.o.v. Thomas plot, <i>single center</i> richtlijnen</li> <li>• Werd niet geëvalueerd in de praktijk</li> <li>• Geen vergelijking met andere protocollen</li> </ul>

## 2.2 Finaal protocol

Daar elk individueel protocol gekenmerkt wordt door verscheidene voor- en nadelen, werd er geopteerd om een eigen protocol op te stellen dat de sterktes van verschillende protocollen combineert. Protocollen die werden gevalideerd door onafhankelijke onderzoeksgroepen, zijnde **protocol 9** (originele Thomas plot) en **protocol 10** (alternatieve Thomas plot), en/of protocollen die werden opgesteld door toonaangevende instanties, zijnde **protocol 3** (geactualiseerd protocol NHG), genoten hierbij de voorkeur. Omwille van de noodzaak van de analyse van sTfR volgens **protocol 9** (originele Thomas plot), wat niet wordt uitgevoerd in het laboratorium van AZ Sint-Jan en dewelke bovendien meerdere gebreken kent (zie tabel 3, 1.3.1 *Klassieke parameters* en 2.1 Protocollen), werd de inclusie van **protocol 10** (alternatieve Thomas plot) verkozen boven **protocol 9** (originele Thomas plot).

Het **eigen protocol** (figuur 16, *Appendices*) is van toepassing voor volwassen patiënten en is hoofdzakelijk gebaseerd op **protocol 3** (geactualiseerd protocol NHG), met uitzondering van enkele wijzigingen:

1. Hoewel **protocol 3** (geactualiseerd protocol NHG) zich nog baseert op een initiële indeling van de anemie volgens het MCV, wordt dit in het **eigen protocol** achterwege gelaten omwille van de mogelijkheid van co-existerende aandoeningen of beginnende anemieën die resulteren in een (nog) normale waarde voor het MCV.
2. Bovendien wordt er in het **eigen protocol**, in tegenstelling tot **protocol 3** (geactualiseerd protocol NHG), geen rekening gehouden met het serumijzergehalte voor de beoordeling van de ijzerstatus, aangezien deze een circadiaanse variatie kent en omdat de concentratie verschilt naargelang de inname via de voeding.
3. In de situatie waarbij er volgens **protocol 3** (geactualiseerd protocol NHG) geen onderscheid gemaakt kan worden tussen FA en ACZ, worden tevens de bepalingen uit **protocol 10** (alternatieve Thomas plot) toegevoegd aan het **eigen protocol** opdat er een onderscheid gemaakt zou kunnen worden tussen beide condities.
4. Verder wordt BSE uit **protocol 3** (geactualiseerd protocol NHG) vervangen door CRP in het **eigen protocol** omwille van eerder aangehaalde redenen (zie 1.3.1 *Klassieke parameters*).
5. Daarnaast wordt de voorwaarde van een gedaald RET-gehalte en gestegen LDH-gehalte in combinatie met een gedaald vitamine B<sub>12</sub>- of foliumzuurgehalte voor de diagnose van anemie door vitamine B<sub>12</sub>-of foliumzuurdeficiëntie volgens **protocol 3** (geactualiseerd protocol NHG) achterwege gelaten, daar deze eerste twee geen strikte voorwaarden zijn om deze oorzaken van anemie te kunnen identificeren.
6. Bovendien wordt de voorwaarde van een afwijkend aantal WBC en/of BP in combinatie met een gedaald RET-aantal voor de diagnose van anemie door beenmergpathologie volgens **protocol 3** (geactualiseerd protocol NHG) achterwege gelaten, aangezien deze eerste twee niet toelaten om een *single lineage* beenmergpathologie op te sporen.
7. Verder wordt de optie 'beenmergpathologie' als mogelijke oorzaak van een vastgestelde anemie uitgebreid naar 'beenmergpathologie of aanmaakstoornis' in het **eigen protocol**.
8. Ook wordt er een bijkomende mogelijke oorzaak van anemie toegevoegd aan het **eigen protocol** ten opzichte van **protocol 3** (geactualiseerd protocol NHG), namelijk anemie door chronisch bloedverlies. Hierbij wordt er expliciet voor de term 'chronisch' gekozen, aangezien de tijd tussen de stimulatie van de erythropoëse als respons op bloedverlies en het verschijnen van RET in het perifeer bloed doorgaans 4 tot 5 dagen bedraagt.
9. Daarenboven wordt er voor situaties waarin er aan geen enkele regel wordt voldaan de generieke oorzaak 'anemie door acuut bloedverlies of onbekende oorzaak' toegevoegd aan het **eigen protocol**.
10. Ondanks dat er in **protocol 3** (geactualiseerd protocol NHG) wordt aanbevolen om in het geval van een verhoogd risico op dragerschap van een thalassemie of Hb-variant een Hb-elektroforese of chromatografie uit te voeren, al dan niet aangevuld door DNA-onderzoek, wordt ervoor gekozen om dit niet te includeren in het **eigen protocol**. Dit werd besloten omwille van het feit dat deze klinische informatie niet steeds beschikbaar is, maar ook omdat dit genetische testen betreft die niet routinematig worden uitgevoerd en dus niet 24/7 beschikbaar zijn. Bovendien kennen deze testen een hoge kostprijs en relatief lange *turnaround time*.
11. Tot slot is het **eigen protocol** dan ook louter gebaseerd op parameters die beschikbaar zijn op hedendaagse routineanalyzers en wordt dit aangepast aan de referentiewaarden die in AZ Sint-Jan Brugge gehanteerd worden. Een uitzondering hierop is de *cut-off* voor anemie door nierziekte, dewelke wordt vastgelegd op  $< 45 \text{ mL/min/1.73m}^2$  in plaats van  $< 60 \text{ mL/min/1.73m}^2$ , omdat anemie door nierziekte slechts kan ontstaan vanaf stadium G3b CNI.

Hoewel het **eigen protocol** verschillende voordelen kent, waaronder de automatisatie en standaardisatie van de uitwerking en de interpretatie van een anemie, de mogelijkheid tot het opsporen van gecombineerde oorzaken van anemie, het hebben van richtlijnen die uitgaan van toonaangevende instanties of in de praktijk afgetoetste protocollen als basis, de mogelijkheid tot het opsporen van latente FA en het ontbreken van een classificatie van de anemie op basis van het MCV, zijn er ook enkele nadelen aan verbonden.

Zo wordt aan de hand van het **eigen protocol** een bepaling van het foliumzuur- en vitamine B<sub>12</sub>-gehalte uitgevoerd, wat analyses zijn die slechts éénmaal per kalenderjaar vergoed worden door het Rijksinstituut voor Ziekte- en Invaliditeitsverzekering (RIZIV). Bijgevolg zal er 18 euro aangerekend worden aan de patiënt indien het protocol wordt toegevoegd aan het order van een patiënt waarbij beide analyses reeds werden uitgevoerd tijdens het voorbije kalenderjaar.

Daarnaast laat het **eigen protocol** niet toe om de combinatie van FA en ACZ op te sporen. Dit is te wijten aan het feit dat één van de voorwaarden voor de diagnose FA aan de hand van **protocol 10** (alternatieve Thomas plot) een verhouding tussen de TRF-concentratie en logaritme van de FER-concentratie van minstens 1.71 is, terwijl deze verhouding voor de diagnose van ACZ steeds kleiner dan 1.71 moet zijn. Bijgevolg sluit de ene diagnose de andere steeds uit. Desalniettemin is het mogelijk om met behulp van het protocol een onderscheid te maken tussen beide aandoeningen, wat niet mogelijk is met behulp van **protocol 3** (geactualiseerd protocol NHG).

Tot slot is een protocol steeds een vereenvoudiging van een soms complexe klinische realiteit die gepaard gaat met multifactoriële oorzaken van een pathologie en is geen enkel protocol in staat om alle mogelijke klinische situaties te omvatten. Het opgestelde anemieprotocol kan dus een indicatie geven omtrent mogelijke oorzaken van een anemie, maar het klinisch oordeel van de arts, waarbij er rekening wordt gehouden met de voorgeschiedenis van de patiënt (bijvoorbeeld geneesmiddelengebruik, andere ziektebeelden ...), blijft van primordiaal belang.

### 3. Praktische uitwerking en implementatie van het protocol

#### 3.1 Technische aspecten

##### 3.1.1 Automatisch toevoegen van stalen en testen

Voor patiënten van de **VOE** worden de individuele bepalingen uit het anemieprotocol slechts toegevoegd aan het order en uitgevoerd indien de aanvraag gebeurde door de VOE én wanneer **de Hb-concentratie lager is dan 10.0 g/dL**, onafhankelijk van het geslacht van de patiënt. Het anemieprotocol dient dan ook **niet uitdrukkelijk aangevraagd te worden** door de aanvragende arts van de VOE, aangezien de bepalingen uit het protocol **automatisch** worden toegevoegd aan het order wanneer er aan de eerder vermelde voorwaarden wordt voldaan. Hierbij kan er opgemerkt worden dat de *cut-off* voor de Hb-concentratie afwijkt ten opzichte van deze uit de literatuur. Deze werd echter in samenspraak met de VOE vastgelegd, daar een hogere *cut-off* zou leiden tot een overmaat aan uit te voeren testen bij patiënten waarbij de klinische relevantie van de uitwerking van de anemie minder van belang is.

Voor de uitwerking van het anemieprotocol is het belangrijk dat de aanvragende arts het bloed van de patiënt afneemt in verschillende tubes, namelijk minstens één EDTA-tube en één serumtube, aangezien er voor de verschillende analyses uit het protocol een ander voorkeursmateriaal van toepassing is. Omdat het niet steeds op voorhand geweten is of de patiënt anemisch is en of de individuele bepalingen bijgevolg uitgevoerd zullen moeten worden, wordt steeds **bij elke aanvraag** van de VOE automatisch een serumtube toegevoegd aan de EDTA-tube via het elektronisch aanvraagstelsel (Cyberlab Order Entry).

Daarnaast kan het anemieprotocol **actief worden aangevraagd** door de hematologen aan de hand van een **specifieke aanvraagcode**. In deze situatie worden de bepalingen van het anemieprotocol reeds toegevoegd aan het ordernummer indien de **Hb-concentratie lager is dan 13.5 g/dL (man) of 11.7 g/dL (vrouw)**, wat overeenkomt met de referentiewaarden die gehanteerd worden in AZ Sint-Jan Brugge en wat dus verschilt ten opzichte van de *cut-off* die werd vastgelegd voor de VOE. **Wanneer het anemieprotocol actief wordt aangevraagd**, wordt er eveneens automatisch een serumtube toegevoegd aan de EDTA-tube via het elektronisch aanvraagstelsel (Cyberlab Order Entry).

##### 3.1.2 Interpretatie volgens het automatisch anemieprotocol

De regels die werden geprogrammeerd in het laboratoriuminformatiesysteem (LIS) om het protocol te interpreteren zijn terug te vinden in tabel A4 (zie *Appendices*).

Wanneer de bepalingen uit het protocol worden uitgevoerd, wordt steeds het volledige protocol doorlopen voor de interpretatie opdat het vaststellen van een combinatie van oorzaken van de anemie mogelijk zou zijn. Vervolgens worden alle mogelijke oorzaken (cfr. groene kaders in figuur 16, *Appendices*) die voor de patiënt van toepassing zijn gecombineerd in een integraal besluit dat zichtbaar is voor de clinicus.



### 3.2 Technische validatie van de programmatie in het LIS

Voor de validatie van het anemieprotocol werd er nagegaan of het aanvraagproces door de VOE, zijnde het automatisch toevoegen van tubes en van bepalingen bij een Hb-concentratie die lager is dan 10.0 g/dL en het automatisch interpreteren van enkelvoudige en gecombineerde oorzaken van anemie correct werden geprogrammeerd in het LIS, zowel bij fictieve, volwassen patiënten als bij daadwerkelijke, volwassen patiënten. De technische validatie wees uit dat beide processen correct verlopen (data niet getoond).

### 3.3 Preliminare data klinische validatie

Voor de klinische validatie van het anemieprotocol worden voor ambulante, anemische patiënten de resultaten van de interpretatie volgens het anemieprotocol gecorreleerd met de conclusie van de klinisch hematoloog.

## 4. Besluit

Hoewel er op basis van het literatuuronderzoek elf protocollen in aanmerking kwamen voor implementatie, werd er geopteerd om een eigen protocol op te stellen dat de voordelen van verscheidene protocollen combineert. Het eigen protocol, dat gebaseerd is op onafhankelijk gevalideerde protocollen en protocollen die worden aangereikt door toonaangevende instanties en dat werd aangepast naar de praktische werking van het laboratorium van AZ Sint-Jan, laat toe om de onderliggende oorzaak of combinatie van oorzaken van een (preoperatieve) anemie op een geautomatiseerde, gestandaardiseerde en proactieve wijze op te sporen. Deze automatisatie laat bovendien een gestandaardiseerde interpretatie toe, evenals een snellere uitwerking van de anemie en snellere rapportering van de mogelijke oorzaken naar de kliniek toe. De implementatie van dit protocol draagt dan ook bij aan een meer gestandaardiseerd (preoperatief) beleid, wat kan leiden tot een reductie van peri- en postoperatieve complicaties en kosten en op deze manier bijdraagt aan een betere patiëntenzorg en patiëntveiligheid.

## To do/ACTIONS

---

- 1) Klinische validatie van het anemieprotocol in samenwerking met de dienst hematologie.
- 2) Opvolgen van de reductie van het aantal patiënten met preoperatieve anemie na implementatie van het anemieprotocol.
- 3) Integratie van het anemieprotocol in een breder project omtrent *Patient Blood Management* op de VOE.

## ATTACHMENTS

---

Tabel A1: Vormen van CDA (48).

Type	Karakteristieken van de anemie	Beenmerg	Niet-hematologische kenmerken	Genen	Overerving
I	Matige tot ernstige, macrocytaire anemie, laag aantal RET ten opzichte van de graad van anemie	Erytroïde hyperplasie, megaloblastoïde vormen, nucleaire chromatinebruggen tussen erytroblasten	Afwijkingen van de distale ledematen, misvorming van de borstwand, klein postuur	<i>CDANI</i> <i>C15orf41</i>	Autosomaal recessief
II	Asymptomatisch (10 %), milde tot matige anemie (70 %), ernstige transfusie-afhankelijke anemie (20 %), normo- of macrocytair, laag aantal RET ten opzichte van de graad van anemie, associatie met hemolyse	Hypercellulair met erytroïde hyperplasie, bi- en multinucleaire erytroblasten	Doorgaans afwezig	<i>SEC23B</i>	Autosomaal recessief
III	Milde tot matige anemie, normo- of macrocytair, laag aantal RET ten opzichte van de graad van anemie, associatie met hemolyse	Hypercellulair met erytroïde hyperplasie, multinucleaire erytroblasten (tot 12 nucleï)	Visuele beperkingen, abnormaliteiten ter hoogte van de retina, monoklonale gammopathie	<i>KIF23</i>	Autosomaal dominant
IV	Matige tot ernstige anemie, normo- of macrocytair, laag aantal RET ten opzichte van de graad van anemie, associatie met hemolyse, toegenomen HbF-fractie	Hypercellulair met erytroïde hyperplasie, multinucleaire erytroblasten	Geen beschreven	<i>KLF1</i>	Autosomaal dominant

Tabel A2: Cut-offs voor anemie (56,57,58,59,60).

<b>WHO (56)</b>				
Leeftijdsgroep	Referentiewaarde (g/dL)	Anemie (g/dL)		
		Mild	Matig	Ernstig
Kinderen van 6 t.e.m. 59 maanden	≥ 11.0	10.0-10.9	7.0-9.9	<7.0
Kinderen van 5 t.e.m. 11 jaar	≥ 11.5	11.0-11.4	8.0-10.9	<8.0
Kinderen van 12 t.e.m. 14 jaar	≥ 12.0	11.0-11.9	8.0-10.9	<8.0
Niet-zwangere vrouwen ≥ 15 jaar	≥ 12.0	11.0-11.9	8.0-10.9	<8.0
Zwangere vrouwen ≥ 15 jaar	≥ 11.0	10.0-10.9	7.0-9.9	<7.0
Mannen ≥ 15 jaar	≥ 13.0	11.0-12.9	8.0-10.9	<8.0
<b>American Society of Hematology (57)</b>				
Leeftijdsgroep	Referentiewaarde (g/dL)			
Volwassen man	≥ 13.5			
Volwassen vrouw	≥ 12.0			
<b>CDC (58)</b>				
Leeftijdsgroep	Referentiewaarde (g/dL)			
Kinderen van 1 tot 2 jaar	≥ 11.0			
Kinderen van 2 tot 5 jaar	≥ 11.1			
Kinderen van 5 tot 8 jaar	≥ 11.5			
Kinderen van 8 tot 12 jaar	≥ 11.9			
Mannen van 12 tot 15 jaar	≥ 12.5			
Vrouwen van 12 tot 15 jaar	≥ 11.8			
Mannen van 15 tot 18 jaar	≥ 13.3			
Vrouwen van 15 tot 18 jaar	≥ 12.0			
Mannen ≥ 18 jaar	≥ 13.5			
Vrouwen ≥ 18 jaar	≥ 12.0			
<b>AZ Sint-Jan Brugge (59,60)</b>				
Leeftijdsgroep	Referentiewaarde man (g/dL)	Referentiewaarde vrouw (g/dL)		
Kinderen t.e.m. 14 dagen	13.9-19.1	13.4-20.0		
Kinderen t.e.m. 30 dagen	10.0-15.3	10.8-14.6		
Kinderen t.e.m. 60 dagen	8.9-12.7	9.2-11.4		
Kinderen t.e.m. 180 dagen	9.6-12.4	9.9-12.4		
Kinderen t.e.m. 2 jaar	10.1-12.5	10.2-12.7		
Kinderen t.e.m. 6 jaar	10.2-12.7	10.2-12.7		
Kinderen t.e.m. 12 jaar	10.7-13.4	10.6-13.2		
Kinderen t.e.m. 18 jaar	11.0-14.5	10.8-13.3		
Volwassenen > 18 jaar	13.5-17.0	11.7-15.1		

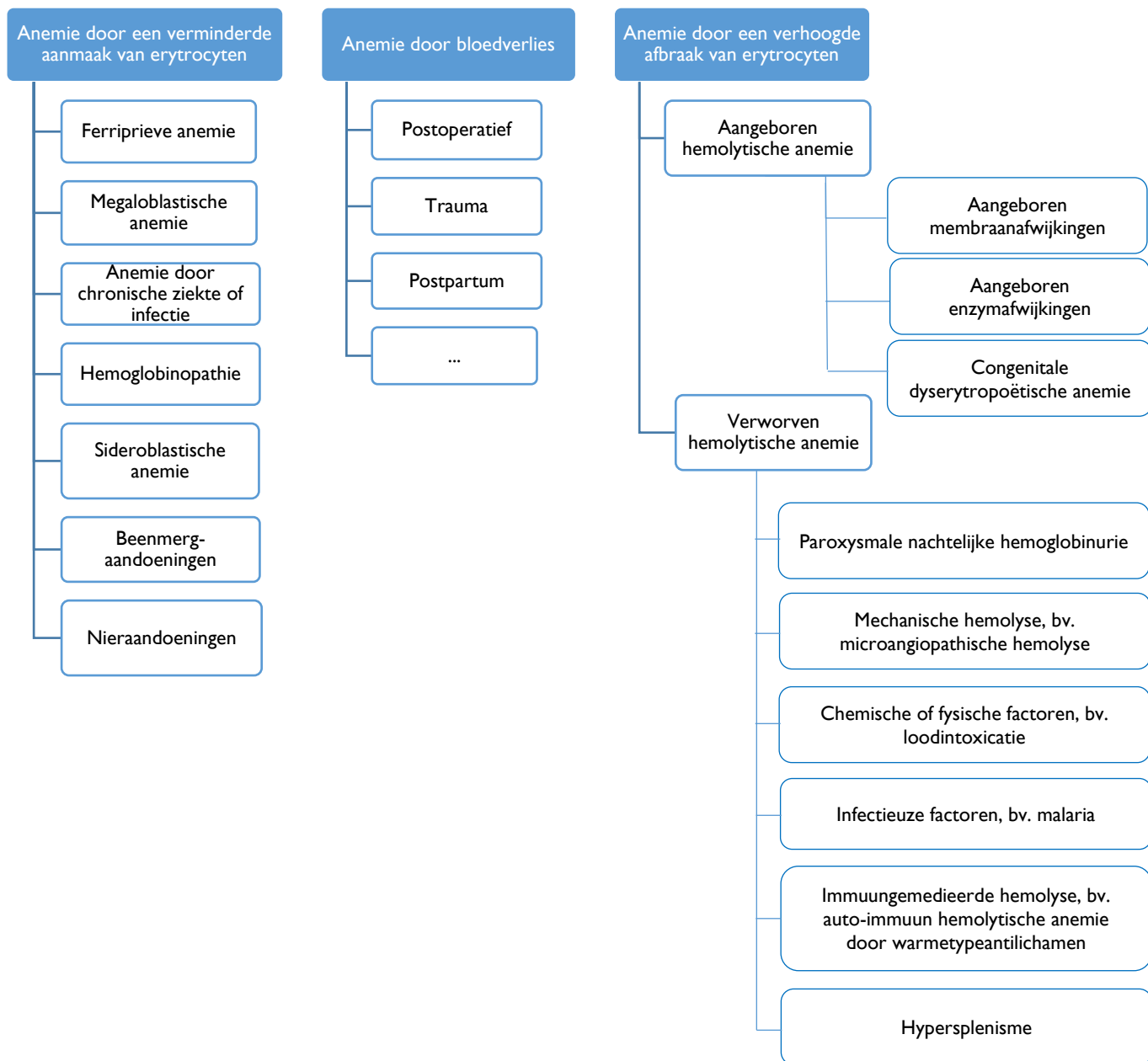
Tabel A3: Referentiewaarden bij volwassenen ouder dan 18 jaar (59,61).

Parameter	Referentiewaarde	Eenheid
BP	163-347	10 <sup>9</sup> /L
BSE	2-15 (man), 2-25 (vrouw)	mm/u
Creatinine	0.60-1.10 (man), 0.50-0.80 (vrouw)	mg/dL
CRP	<5.0	mg/L
Delta-He	2 – 8	pg
eGFR	>60	mL/min/1.73m <sup>2</sup>
FER	20-250 (man), 10-120 (vrouw)	µg/L
Foliumzuur	>5.4	µg/L
Haptoglobine	0.3-2.0	g/L
Hb	13.5-17.0 (man), 11.7-15.1 (vrouw)	g/dL
Hepcidine-25	1.7-7.2	nmol/L
Hypo-He	<17 <5	pg per RBC %
Ijzer	59-158 (man), 37-145 (vrouw)	µg/dL
Ijzersaturatie	20-50 (man), 15-50 (vrouw)	%
Indirect bilirubine	<1.1	mg/dL
IRF	1.6-10.5	%
LDH	120-246	U/L
Mean corpuscular hemoglobin (MCH)	28-33 (man), 27-33 (vrouw)	pg
MCHC	31.6-35.5 (man), 31.3-34.8 (vrouw)	g/dL
MCV	84-96 (man), 83-99 (vrouw)	fL
EPO	4.3-29	mIU/mL
RDW	11.4-13.6 (man), 11.3-14.0 (vrouw)	%
RET-He	1-5 28-29	% pg
RET-aantal	0.52-1.86 (man), 0.45-1.78 (vrouw) 0.023-0.095 (man), 0.016-0.082 (vrouw)	% 10 <sup>12</sup> /L
RET-volume	100-114	fL
RBC	4.36-5.78 (man), 3.81-5.13 (vrouw)	10 <sup>12</sup> /L
RPI	0.5-2.5	%
sTfR	1.9-4.4	mg/L
TRF	2.15-3.65 (man), 2.50-3.80 (vrouw)	g/L
TRF-saturatie	15.8-49.3 (man), 13.5-45.6 (vrouw)	%
Vitamine B12	211-911	ng/L
WBC	4.3-9.6	10 <sup>9</sup> /L

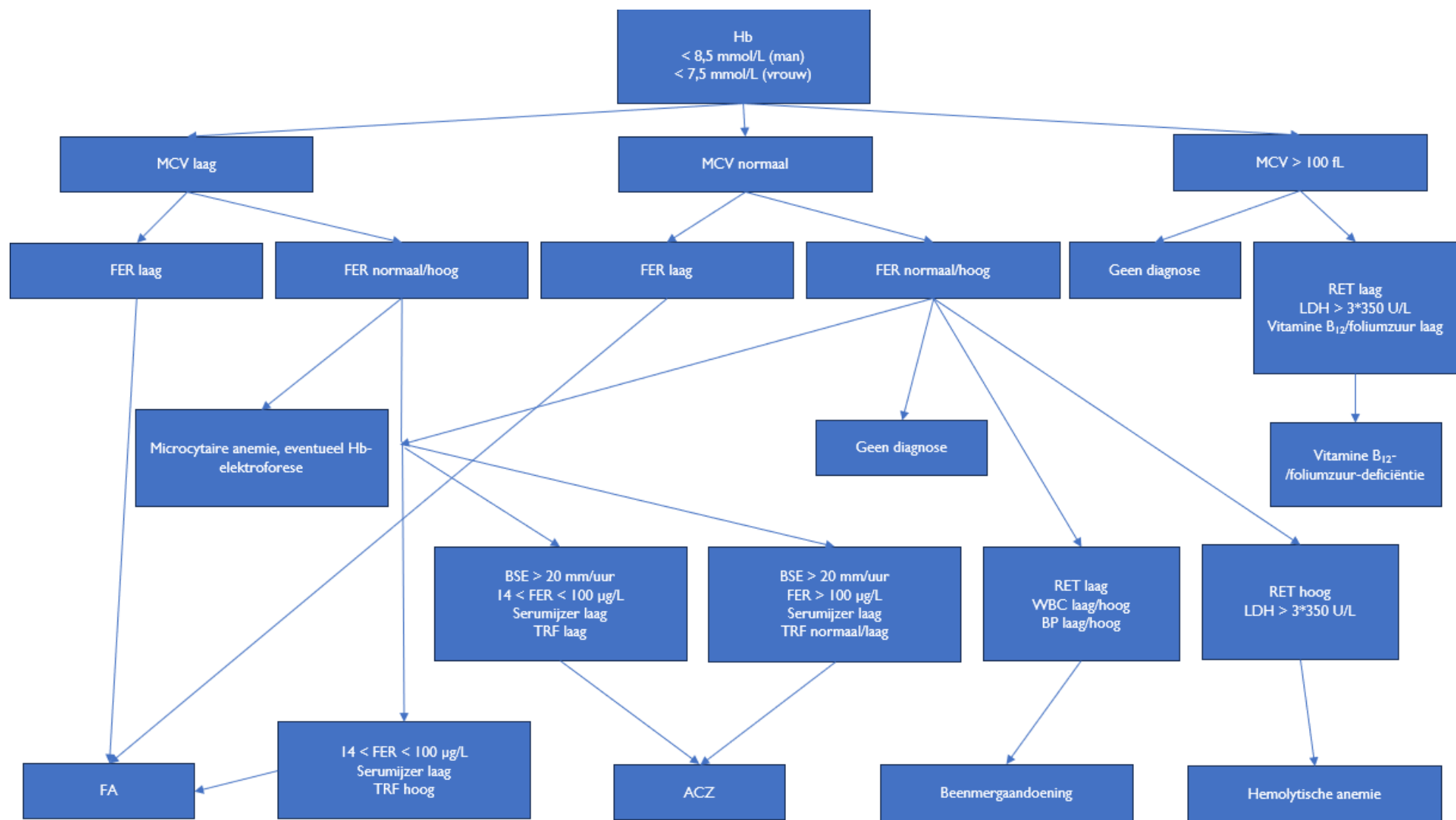
Tabel A4: Regels die werden geprogrammeerd in het LIS voor de interpretatie van het anemieprotocol voor patiënten van de VOE.

\* < 13.5 g/dL (man) of < 11.7 g/dL (vrouw) indien de aanvraag gebeurde door een hematoloog.

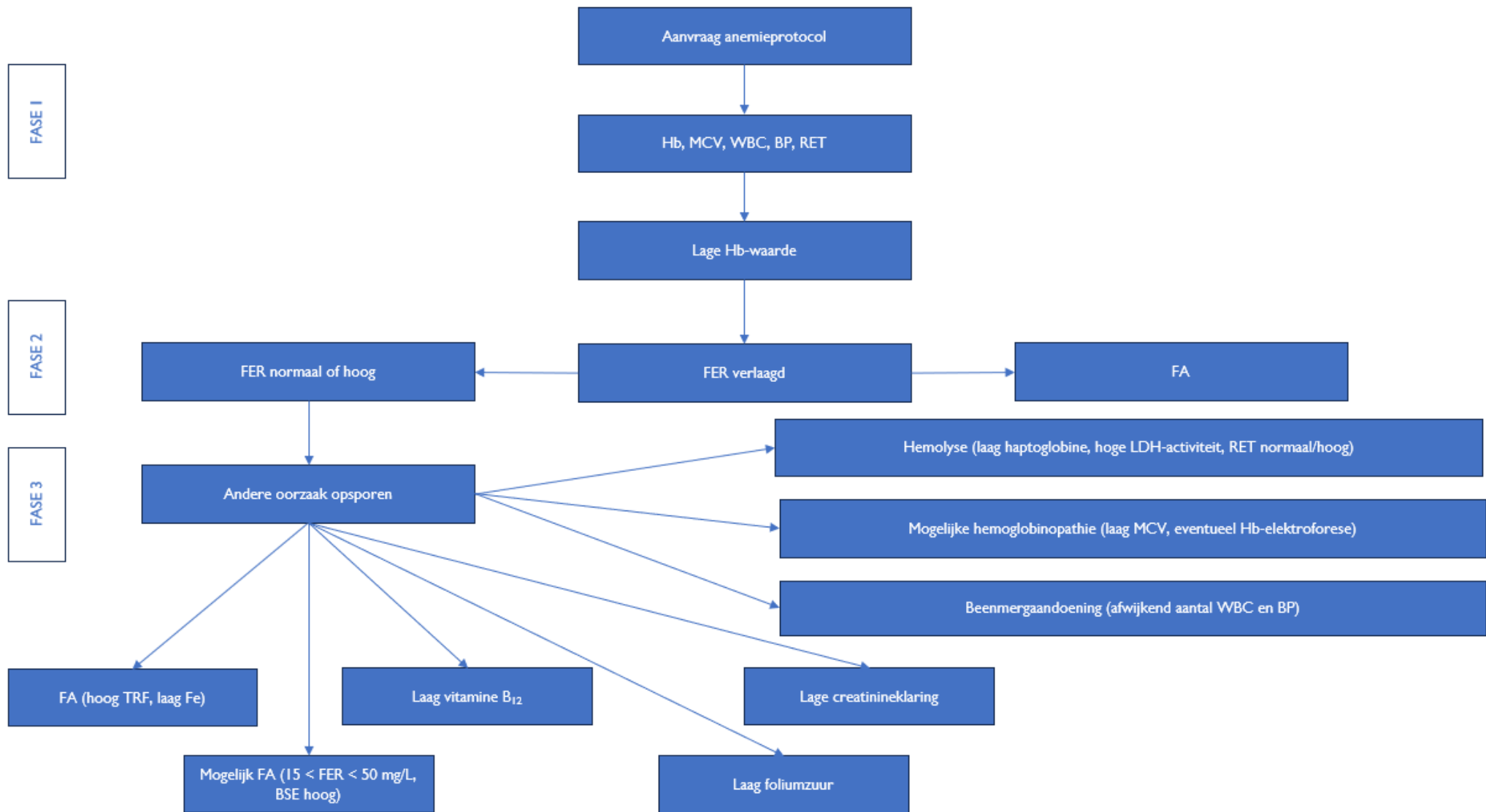
Regel	Besluit: "Anemie mogelijk door..."
Als Hb < 10.0 g/dL* én FER < 20 µg/L (man), < 10 µg/L (vrouw)	Ijzerdeficiëntie
Als Hb < 10.0 g/dL* én FER 20-100 µg/L (man), 10-100 µg/L (vrouw) én TRF > 3.65 g/L (man), > 3.80 g/L (vrouw)	Ijzerdeficiëntie
Als Hb < 10.0 g/dL* én CRP ≥ 5.0 mg/L én TRF ≤ 2.15-3.65 g/L (man), ≤ 2.50-3.80 g/L (vrouw) én FER 20-100 µg/L (man), 10-100 µg/L (vrouw) én RET-He > 31.2 pg én TRF/log(FER) > 1.71	Ijzerdeficiëntie
Als Hb < 10.0 g/dL* én CRP ≥ 5.0 mg/L én TRF ≤ 2.15-3.65 g/L (man), ≤ 2.50-3.80 g/L (vrouw) én FER 20-100 µg/L (man), 10-100 µg/L (vrouw) én RET-He < 31.2 pg én TRF/log(FER) > 1.71	Ijzerdeficiëntie
Als Hb < 10.0 g/dL* én CRP ≥ 5.0 mg/L én TRF ≤ 2.15-3.65 g/L (man), ≤ 2.50-3.80 g/L (vrouw) én FER 20-100 µg/L (man), 10-100 µg/L (vrouw) én RET-He < 31.2 pg én TRF/log(FER) < 1.71	Chronische ziekte
Als Hb < 10.0 g/dL* én CRP ≥ 5.0 mg/L én TRF ≤ 2.15-3.65 g/L (man), ≤ 2.50-3.80 g/L (vrouw) én FER > 100 µg/L	Chronische ziekte
Als Hb < 10.0 g/dL* én vitamine B <sub>12</sub> < 211 ng/L	Vitamine B <sub>12</sub> -deficiëntie
Als Hb < 10.0 g/dL* én foliumzuur < 5.4 µg/L	Foliumzuurdeficiëntie
Als Hb < 10.0 g/dL* én eGFR < 45 mL/min/1.73m <sup>2</sup>	Nierziekte
Als Hb < 10.0 g/dL* én RET > 0.095*10 <sup>12</sup> /L (man), > 0.082*10 <sup>12</sup> /L (vrouw) én LDH > 246 U/L	Hemolyse
Als Hb < 10.0 g/dL* én RET < 0.023*10 <sup>12</sup> /L (man), < 0.016*10 <sup>12</sup> /L (vrouw)	Beenmergpathologie of aanmaakstoornis
Als Hb < 10.0 g/dL* én RET > 0.095*10 <sup>12</sup> /L (man), > 0.082*10 <sup>12</sup> /L (vrouw) én LDH < 246 U/L	Chronisch bloedverlies
Geen van bovenstaande	Acuut bloedverlies of onbekende oorzaak



Figuur 1: Soorten anemie (16,22).

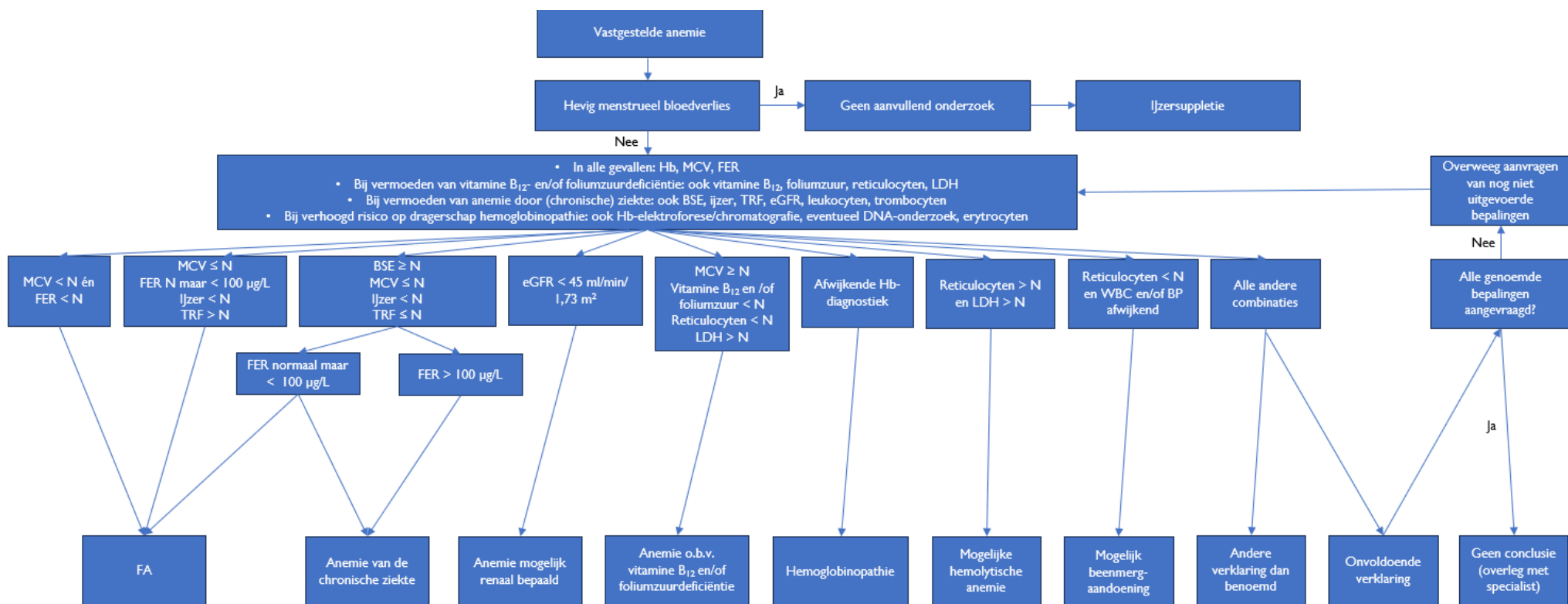


Figuur 2: **Protocol I** – Origineel NHG-stroomschema voor aanvullende onderzoeken bij anemie (68,69).

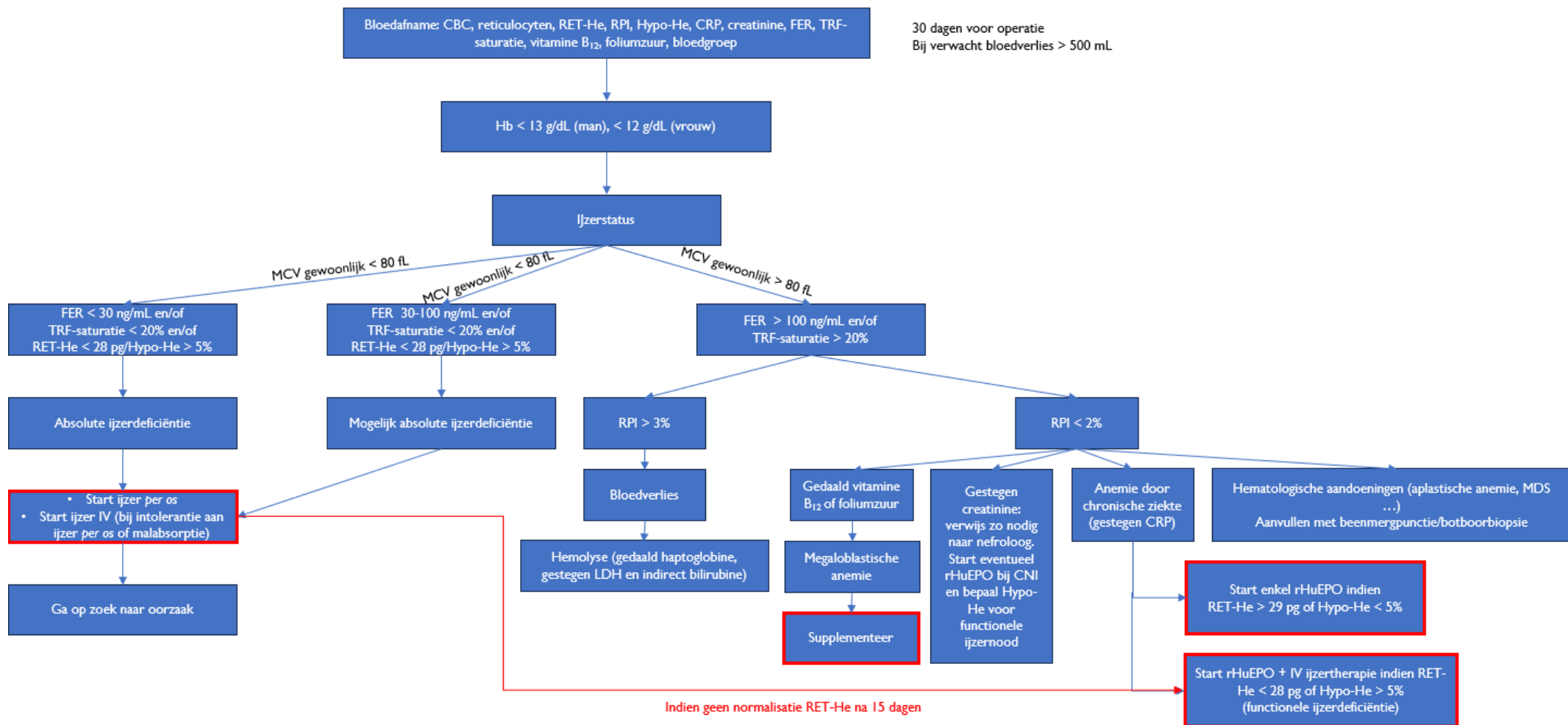


Figuur 3: **Protocol 2** – Alternatief stroomschema volgens Oosterhuis et al. (69).

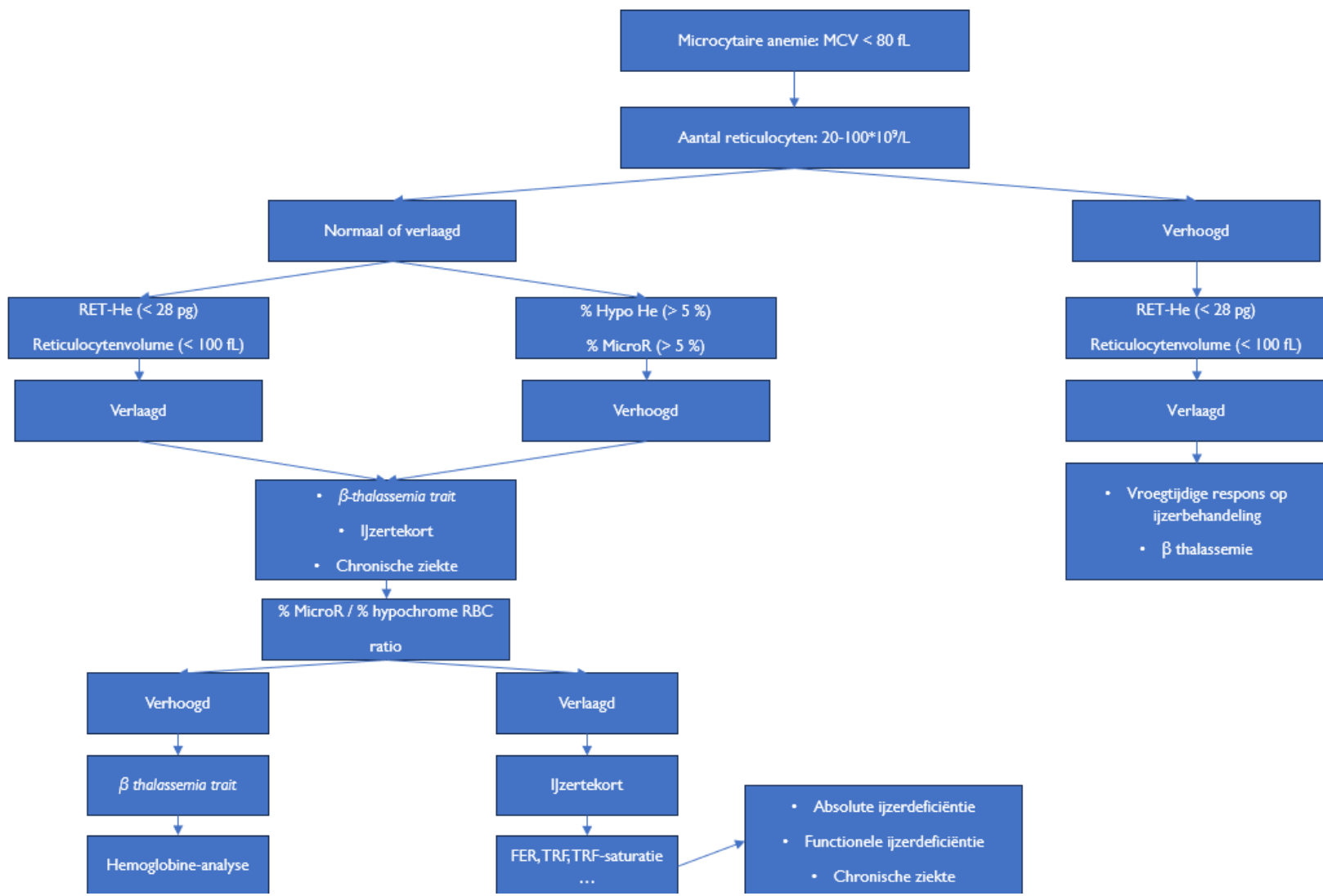




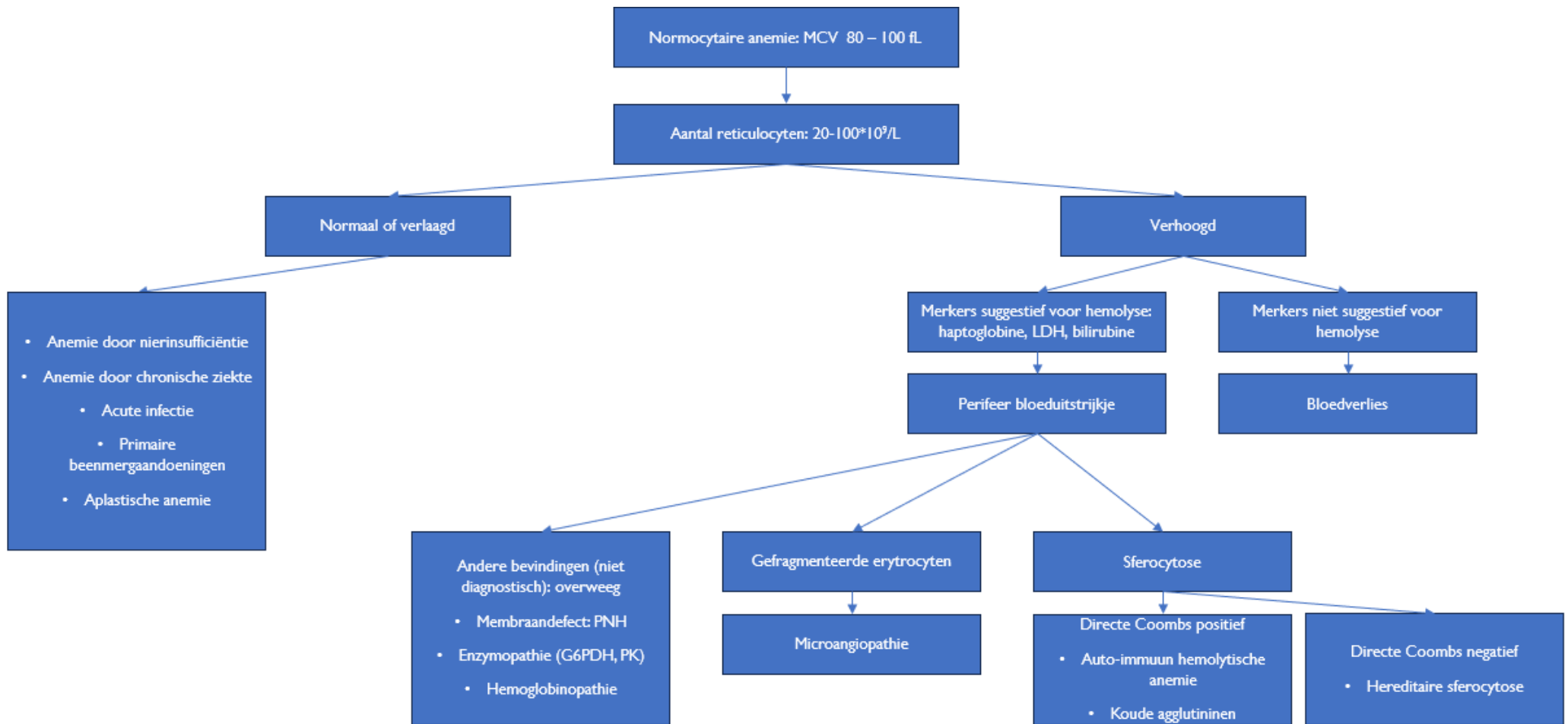
Figuur 4: **Protocol 3** – Geactualiseerd NHG-stroomschema voor aanvullende onderzoeken bij anemie (68). (N = normaal)



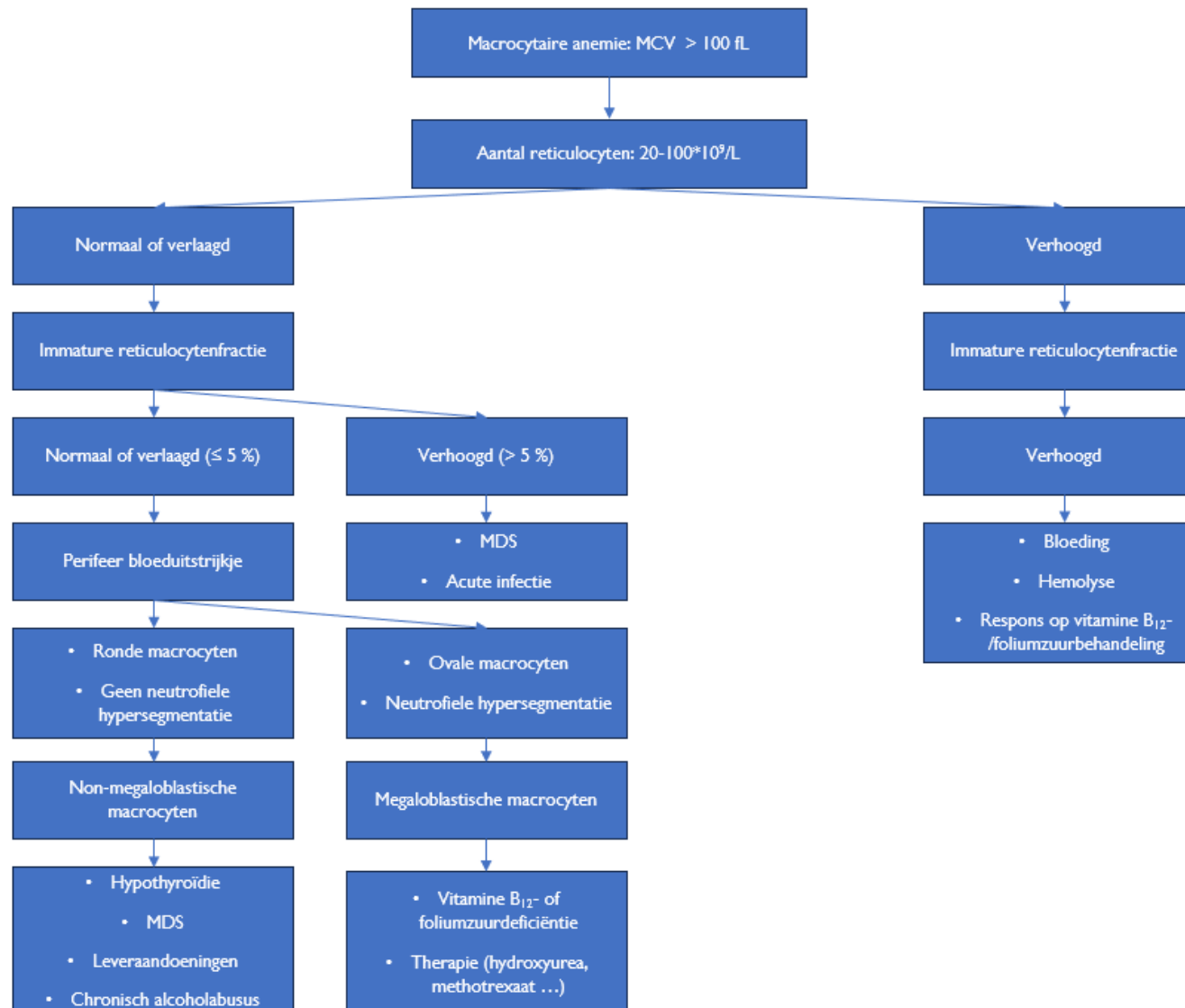
Figuur 5: **Protocol 4** – Protocol voor diagnose en behandeling van preoperatieve anemie volgens Stockman et al. (71).



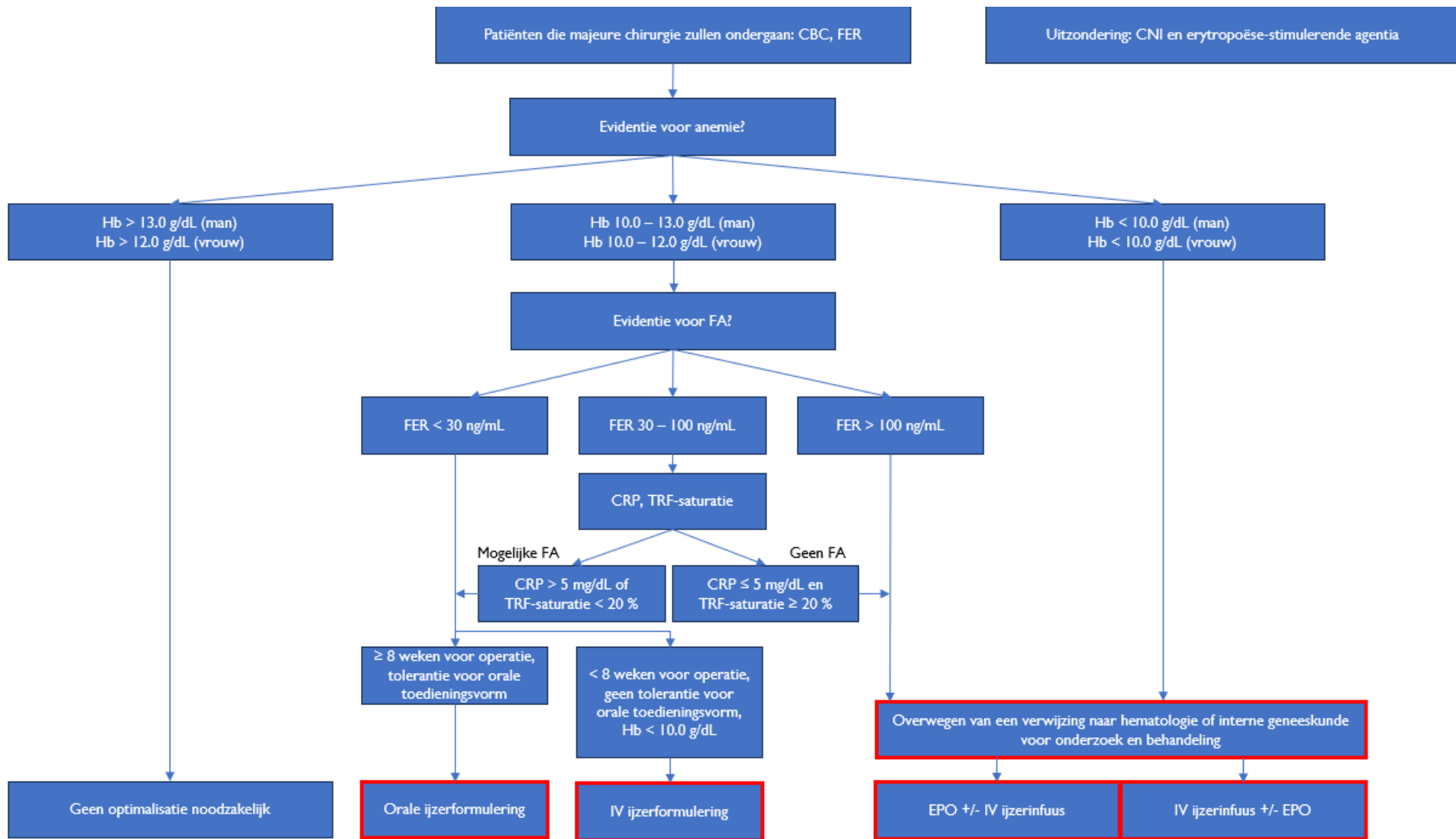
Figuur 6: **Protocol 5.1** – Protocol voor de uitwerking van microcytaire anemie volgens Buttarello (67).



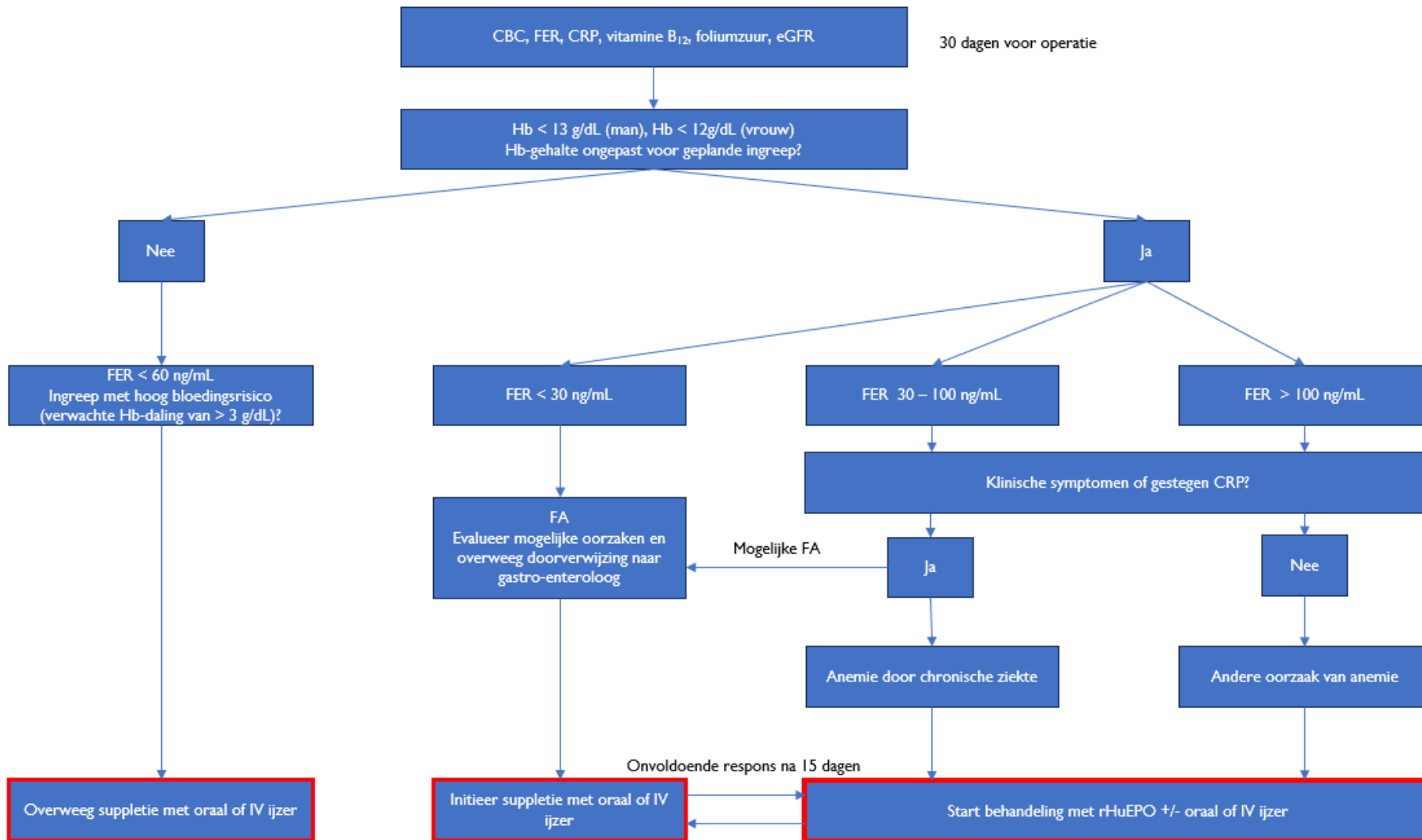
Figuur 7: **Protocol 5.2** – Protocol voor de uitwerking van normocytair anemie volgens Buttarello (67).



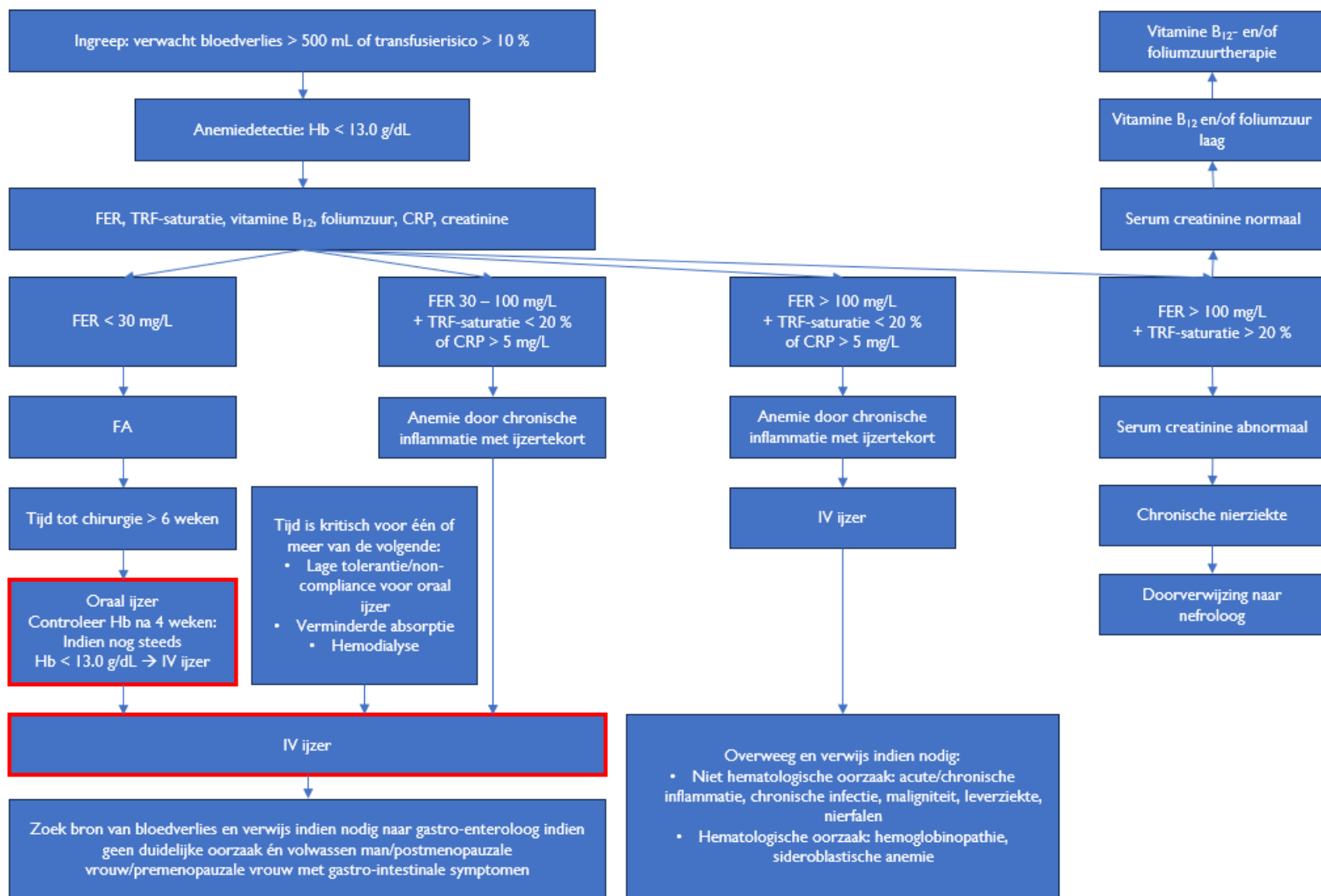
Figuur 8: **Protocol 5.3** – Protocol voor de uitwerking van macrocytaire anemie volgens Buttarello (67).



Figuur 9: **Protocol 6** – Protocol voor de diagnose en behandeling van preoperatieve anemie met nadruk op ijzerdeficiëntie volgens Greenberg et al. (3).

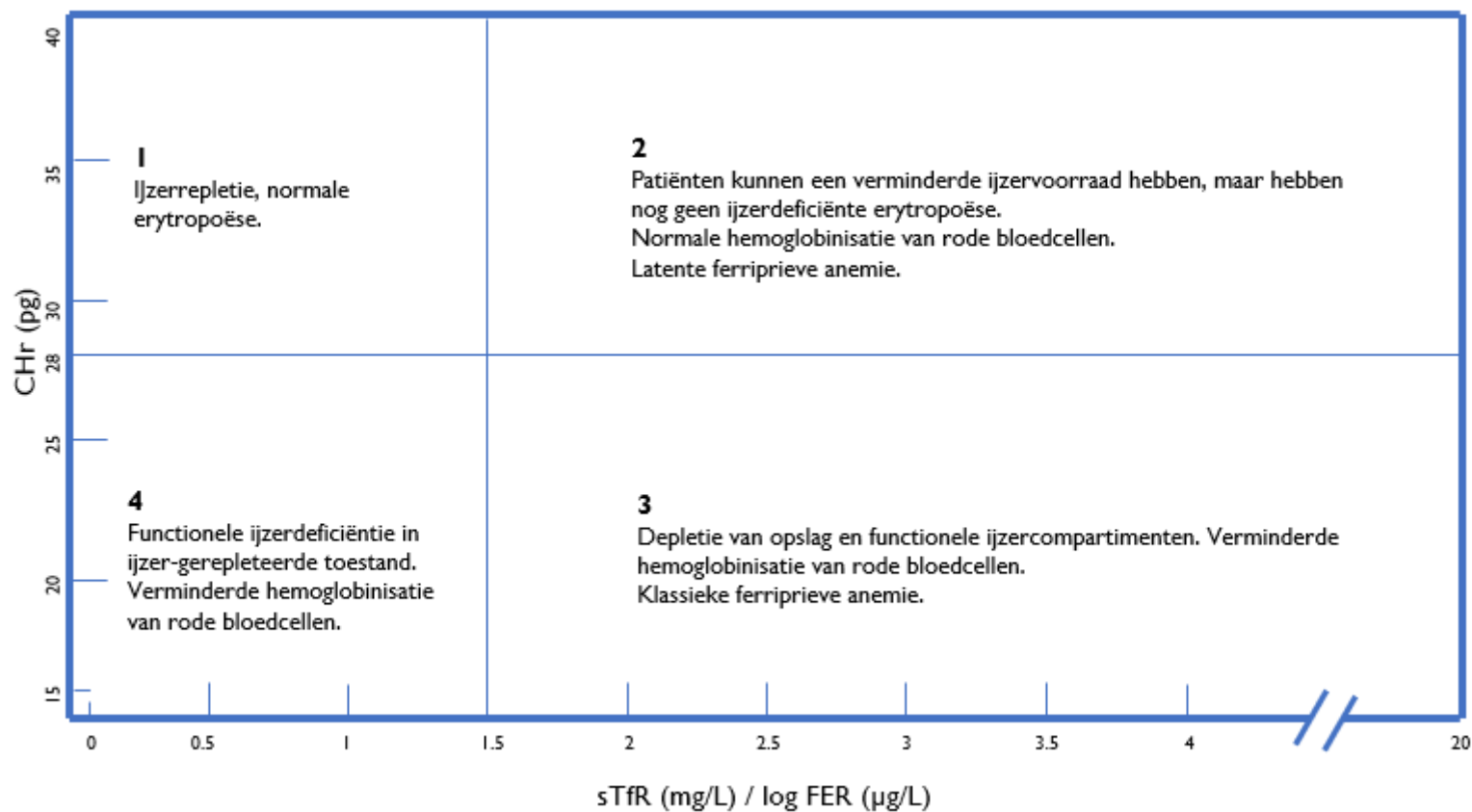


Figuur 10: **Protocol 7** – Protocol voor de uitwerking van preoperatieve anemie volgens Bisbe et al. (4).

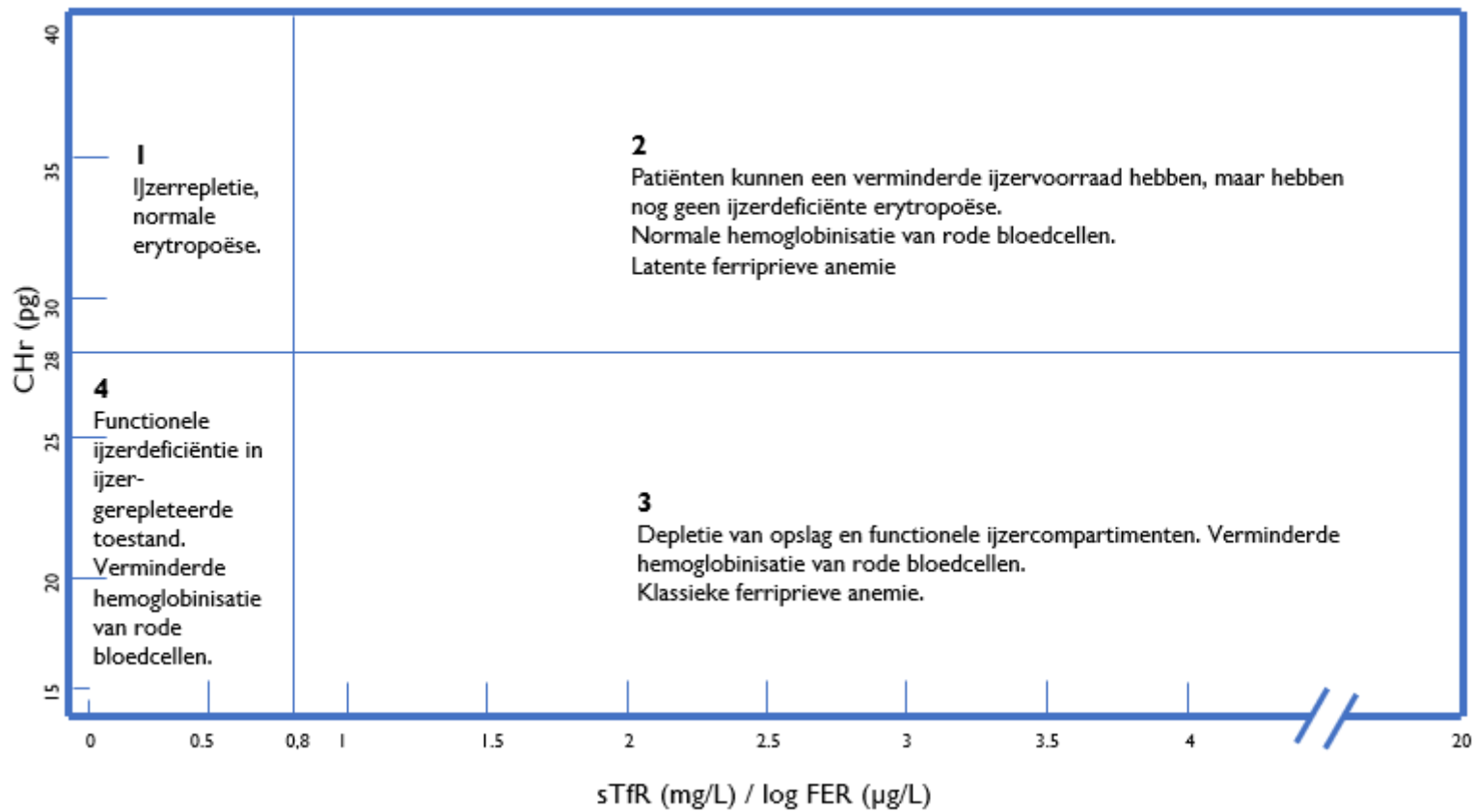


Figuur 11: **Protocol 8** – Protocol voor de uitwerking van preoperatieve anemie met inbegrip van richtlijnen voor behandeling volgens Munting et al. (73).

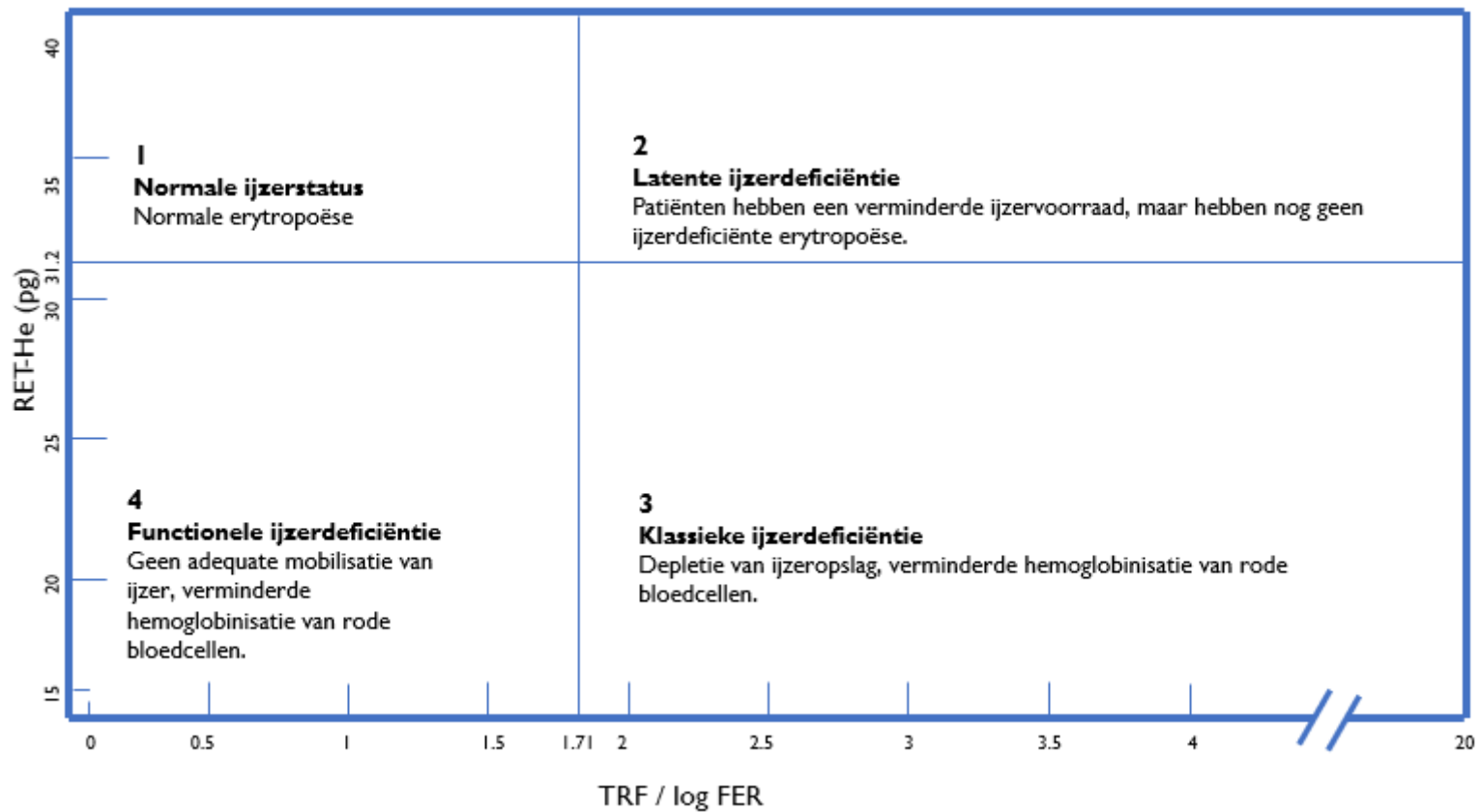




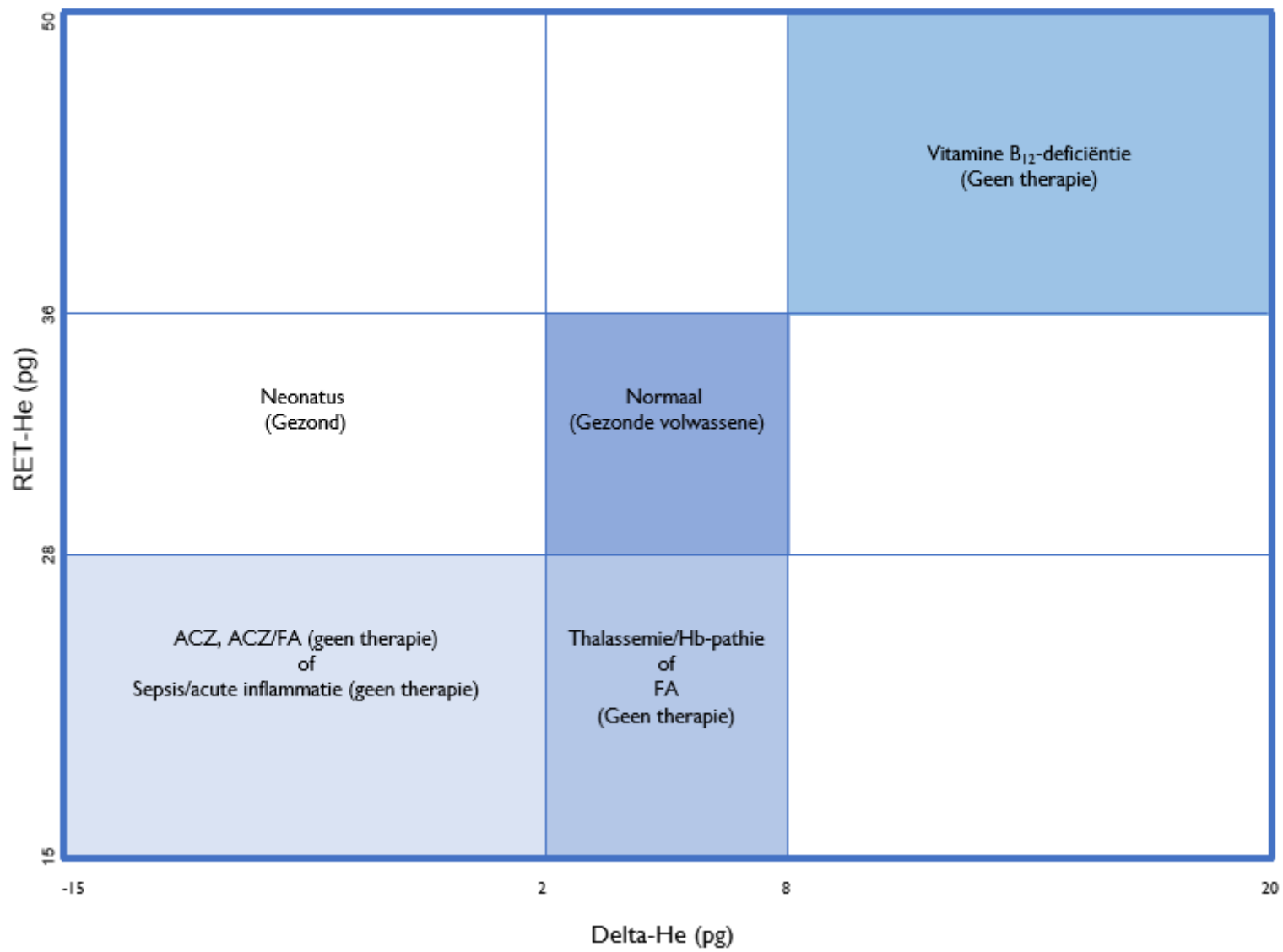
Figuur 12: **Protocol 9** – Originele Thomas plot voor patiënten met een CRP kleiner of gelijk aan 5 mg/L volgens Thomas et al. (74).



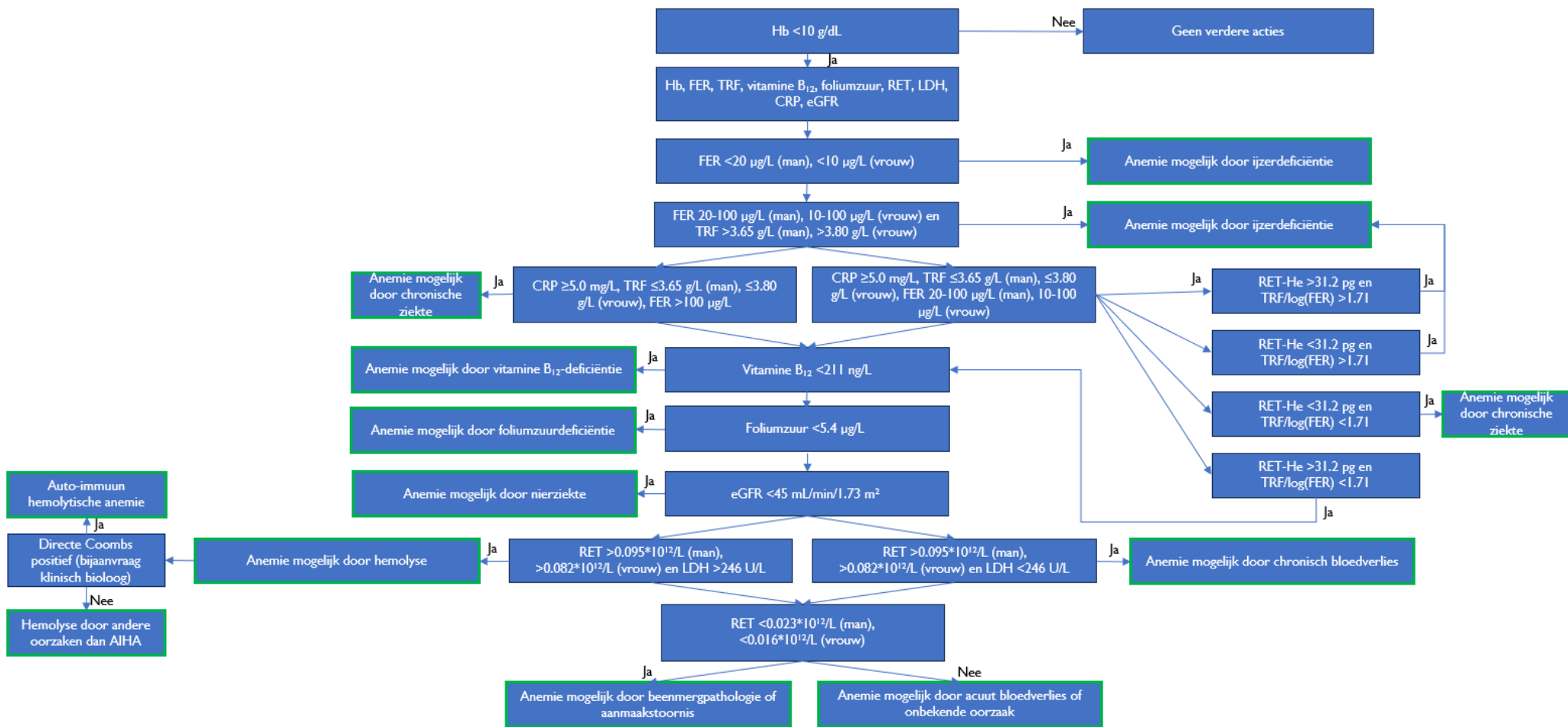
Figuur 13: **Protocol 9** – Originele Thomas plot voor patiënten met een CRP groter dan 5 mg/L volgens Thomas et al. (74).



Figuur 14: **Protocol 10** – Alternatieve Thomas plot volgens de Leur et al. (81).



Figuur 15: **Protocol II** – Hema-Plot volgens Weimann et al. (83).



Figuur 16: Finaal protocol voor de diagnostische uitwerking van (preoperatieve) anemie.

