

Esferocitosis hereditaria: experiencia clínica y diagnóstica en Argentina*

Hereditary spherocytosis: clinical and diagnostic experience in Argentina

Esferocitose hereditária: experiência clínica e diagnóstica na Argentina

► Renée Leonor Crisp^{1a,b,c}, Eliana García^{2d}, Liliana Solari^{3e},
María Cristina Rapetti^{4f}, Alcira Nesse^{1b}, Hugo Donato^{4c,f}

¹ Doctora en Ciencias Químicas. Licenciada en Análisis Biológicos. Licenciada en Ciencias Químicas.

² Médica. Especialista en Pediatría. Especialista en Hematología infantil.

³ Bioquímica. Especialista en Biología Molecular Médica.

⁴ Médico. Especialista en Pediatría. Especialista en Hematología. Especialista en Hematología Infantil.

^a División Hematología Clínica, Hospital Nacional Profesor A. Posadas, Palomar, Buenos Aires, Argentina.

^b Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

^c Consultorios de Hematología Infantil, Buenos Aires, Argentina.

^d División Hematología y Oncología Pediátrica, Hospital Nacional Profesor A. Posadas, Palomar, Buenos Aires, Argentina.

^e Laboratorio de Citometría, Hospital Nacional Prof. A. Posadas, Palomar, Buenos Aires, Argentina.

^f Sección Hematología/Oncología, Hospital del Niño de San Justo, San Justo, Buenos Aires, Argentina.

* Subcomisión de Eritropatías, Sociedad Argentina de Hematología.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

Resumen

Los objetivos del presente estudio fueron: a) Analizar las características demográficas y clínicas de nuestra población al diagnóstico; b) Evaluar si las pruebas más recientes presentan ventajas sobre las tradicionales; c) Confirmar la frecuencia de las distintas deficiencias de proteínas de membrana; d) Establecer la relación entre severidad y resultado de las pruebas o tipo de deficiencia. Se analizaron 359 individuos estudiados desde 2007, cuando se incorporaron criohemólisis hipertónica (CH), citometría de flujo con eosina-5'-maleimida (5'EMA-CF), FOE por citometría de flujo (FOE-CF) y electroforesis de proteínas de membrana (SDS-PAGE) al estudio de laboratorio clásico, fragilidad osmótica eritrocitaria (FOE) y autohemólisis (AH). Criterios diagnósticos para Esferocitosis Hereditaria (ESH): esferocitos en frotis y dos pruebas positivas. Se identificaron 174 pacientes con ESH y 22 portadores sanos. El 74,9% eran menores de 12 años. La transmisión fue dominante en el 83,1% de los casos. Tuvieron manifestaciones neonatales 89,1%. Las pruebas con mayor sensibilidad fueron CH (92,0%), FOE diferida (91,1%) y 5'EMA-CF (88,5%). En los 125 pacientes en quienes se realizaron CH, 5'EMA-CF y FOE-CF se observó que todos tenían al menos una prueba positiva; 122 (97,6%) tuvieron dos o tres positivas. Las deficiencias más frecuentes fueron ankirina y espectrina. No hubo diferencia en el resultado de las pruebas entre los subgrupos de severidad. Se concluye que las deficiencias más frecuentes en Argentina son ankirina y espectrina, coincidiendo con otras poblaciones latinoamericanas. El uso simultáneo de CH, 5'EMA-CF y FOE-CF permite diagnosticar más del 97% de los casos. La incidencia de manifestaciones neonatales es elevada.

Palabras clave: esferocitosis hereditaria * anemia hemolítica * membrana eritrocitaria * criohemólisis hipertónica * eosina-5'-maleimida * fragilidad osmótica * citometría de flujo * anemia neonatal * sangre capilar * anemia

Abstract

The aims of this study were (a) to assess demographic and clinical aspects of our population at diagnosis; (b) to evaluate diagnostic accuracy of hypertonic cryohemolysis (HC), eosin-5'-maleimide flow cytometry (EMA-FC) and

flow cytometric osmotic fragility (OF-FC) in relation to standard screening tests osmotic fragility (OF) and autohemolysis (AH); (c) to confirm the previously reported prevalence of membrane proteins defects; and (d) to assess the relationship between severity of anemia and results of confirmatory tests. Since 2007, the following tests were available in our laboratory: OF, AH, HC, EMA-FC, OF-FC and SDS-PAGE of membrane proteins. Diagnostic criteria for hereditary spherocytosis were spherocytes in blood smear plus ≥ 2 positive tests. Data from 359 individuals were analyzed: 174 HS patients and 22 silent carriers were detected; 74.9% of patients were less than 12 years old; 83.1% of them showed a dominant inheritance pattern; antecedent of neonatal jaundice/anemia was registered in 89.1%. Tests with higher sensitivity were: HC (92.0%), incubated OF (91.1%), and EMA-FC (88.5%). HC, EMA-FC and OF-FC were simultaneously performed on 125 patients: each of them had at least 1 positive test; 122 (97.6%) had 2 or 3 positive tests. Ankyrin and spectrin were the most frequently found protein deficiencies. Comparison of test results in relation to severity of anemia showed no difference between groups. It can be concluded that compared to other Latin American countries, ankyrin and spectrin were the most frequent protein deficiencies. Simultaneous performing of HC, EMA-FC and OF-FC enabled diagnosing HS in more than 97% of patients. A high incidence of neonatal jaundice/anemia was observed.

Keywords: hereditary spherocytosis * hemolytic anemia * red blood cell membrane * hypertonic cryohemolysis * eosin-5'-maleimide * osmotic fragility * flow cytometry * neonatal anemia * capillary blood * anemia

Resumo

Os objetivos do presente estudo foram: a) analisar as características demográficas e clínicas de nossa população ao diagnóstico; b) Avaliar se as provas mais recentes apresentam vantagens sobre as tradicionais; c) Confirmar a frequência das diversas deficiências de proteínas de membrana; d) Estabelecer a relação entre severidade e resultado das provas ou tipo de deficiência. Foram analisados 359 indivíduos estudados desde 2007, quando se incorporaram crio-hemólise hipertônica (CH), citometria de fluxo com eosina-5'-maleimida (5'EMA-CF), FOE por citometria de fluxo (FOE-CF) e eletroforese de proteínas de membrana (SDS-PAGE) ao estudo de laboratório clássico - fragilidade osmótica eritrocitária (FOE) e auto-hemólise (AH). Critérios diagnósticos para ESH: esferócitos em esfregaço e duas provas positivas. Foram identificados 174 pacientes com ESH e 22 portadores saudáveis. 74,9% eram menores de 12 anos. A transmissão foi dominante em 83,1%. Tiveram manifestações neonatais 89,1%. As provas com maior sensibilidade foram CH (92,0%), FOE diferida (91,1%) e 5'EMA-CF (88,5%). Nos 125 pacientes aos quais lhes realizaram CH, 5'EMA-CF e FOE-CF se observou que todos tinham no mínimo uma prova positiva; 122 (97,6%) tiveram duas ou três positivas. As deficiências mais frequentes foram anquirina e espectrina. Não houve diferença no resultado das provas entre os subgrupos de severidade. Conclui-se que as deficiências mais frequentes na Argentina são anquirina e espectrina, as quais coincidem com outras populações latinoamericanas. O uso simultâneo de CH, 5'EMA-CF e FOE-CF permite diagnosticar mais de 97% dos casos. A incidência de manifestações neonatais é elevada.

Palavras-chave: esferocitose hereditária * anemia hemolítica * membrana eritrocitária * crio-hemólise hipertônica * eosina-5'-maleimida * fragilidade osmótica * citometria de fluxo * anemia neonatal * sangue capilar * anemia

Introducción

El cuadro clínico típico de la esferocitosis hereditaria (ESH) fue originalmente descrito en 1871, pero la enfermedad recién fue reconocida como tal a principios del siglo pasado, a partir de la detallada comunicación realizada por Minkowski sobre sus manifestaciones clínicas, seguida poco tiempo después por la descripción de la fragilidad osmótica por Chauffard (1-3). Es una anemia hemolítica de observación frecuente, en la cual defectos de la espectrina o de las proteínas que unen la espectrina a la membrana (ankirina, proteína 4.2, banda 3) llevan a la formación de hematíes de forma es-

férica, osmóticamente frágiles, que son selectivamente atrapados y destruidos en el bazo (4).

El defecto molecular primario genera un defecto cuali- o cuantitativo en las proteínas involucradas en mantener el citoesqueleto unido a la bicapa lipídica (5-7). La deficiencia proteica produce, a su vez, alteraciones secundarias en la membrana. La teoría más aceptada dice que la ESH es causada por la desconexión entre el citoesqueleto y la capa bilipídica, seguida de vesiculación de los componentes de superficie que han perdido su soporte (8). Este fenómeno lleva a una progresiva reducción del área de superficie de membrana y, como consecuencia, al cambio de forma del hematíe. Otra de las

consecuencias de estas alteraciones de la membrana es que se vuelve más permeable al sodio y al potasio que las células normales. Este excesivo flujo de Na⁺ hacia el interior del eritrocito activa la ATPasa y, por ende, la bomba de cationes. Por lo tanto aumenta el consumo de ATP y, como consecuencia, se produce un aumento de la glicólisis para suplir la demanda de ATP. En el bazo, la sangre arterial fluye directamente hacia los cordones esplénicos, una masa tortuosa de pasajes estrechos interconectados entre sí, formada por células reticulares, y revestida por fagocitos. Para reingresar a la circulación, los eritrocitos deben atravesar espacios entre las células endoteliales que forman las paredes de los sinusoides venosos. Estos espacios, aun en su máximo punto de distensión, son invariablemente más pequeños que los glóbulos rojos, que deben entonces deformarse en gran medida para atravesarlos. Los esferocitos, al haber perdido su capacidad de deformarse, son selectivamente secuestrados en estos espacios. Durante su detención en el bazo, los esferocitos sufren distintos cambios, que los llevan finalmente a su destrucción (8-18).

La ESH se presenta en todos los grupos étnicos y raciales, con una prevalencia de 1 en 5.000 personas (19). En la Argentina es la anemia hereditaria más frecuente luego de la talasemia *minor*. Puede ser transmitida tanto en forma autosómica dominante como recesiva, y las mutaciones “*de novo*” no son raras (8) (11) (20-22).

La enfermedad se expresa a través de una combinación de manifestaciones clínicas y de laboratorio, siendo sus signos clínicos típicos anemia, ictericia y esplenomegalia (23) (24). Se manifiesta por primera vez generalmente en lactantes o niños mayores, raramente en la adultez. Su expresión clínica es muy variable, oscilando desde pacientes asintomáticos a otros con anemia severa dependientes de transfusiones (23). Los casos típicos no presentan mayores problemas para llegar al diagnóstico, ya que la asociación de historia familiar positiva, hallazgos del examen físico, datos de laboratorio indicativos de hemólisis extravascular, visualización de esferocitos en el extendido de sangre periférica y prueba de Coombs directa negativa son suficientes para tal fin. En otros pacientes, la confirmación diagnóstica puede ser más difícil. Las ESH leves plantean el problema de que los niveles de hemoglobina y bilirrubina pueden ser normales, y además, en el frotis de sangre periférica se visualizan muy aislados esferocitos y en otras ocasiones, ninguno (23). En estos casos puede ser que el diagnóstico se realice incidentalmente a partir de una crisis hemolítica desencadenada por algún episodio febril (24). En el otro extremo, las ESH graves pueden presentar además de los esferocitos, otras alteraciones morfológicas eritrocitarias (acantocitos, equinocitos, poiquilocitos, hematíes con forma de hongo, etc.) que obligan a plantearse el diagnóstico diferencial con otras anemias hemolíticas hereditarias (23). En estos casos, la realización de pruebas diagnósticas confirmatorias se hace imprescindible. Sin

embargo, ninguna de ellas puede detectar el 100% de los pacientes con ESH (23) (26-31). En los últimos años, además de las clásicas pruebas de fragilidad osmótica eritrocitaria (FOE) y autohemólisis a las 48 horas (AH), se han descrito otras técnicas que parecen tener mayor especificidad y sensibilidad para el diagnóstico de ESH. Por tal motivo, desde 2007 en este grupo de trabajo se incorporaron al estudio de laboratorio clásico, que incluía FOE y AH, las pruebas de criohemólisis hipertónica (CH), citometría de flujo con eosina-5'-maleimida (5'EMA-CF), electroforesis de proteínas de membrana (SDS-PAGE) y FOE por citometría de flujo (FOE-CF).

En este trabajo se analizan desde entonces los datos de todos los pacientes estudiados por el grupo, con los siguientes objetivos:

- Analizar las características demográficas y clínicas de nuestra población al diagnóstico y compararlas con las de otras poblaciones.
- Evaluar si las pruebas de más reciente utilización presentan ventajas sobre las pruebas tradicionales.
- Confirmar la frecuencia de las distintas deficiencias de proteínas de membrana en Argentina y compararlas con las comunicadas en otras poblaciones de características étnicas similares.
- Establecer si hay relación entre severidad de la enfermedad y forma de transmisión, resultado de las pruebas de laboratorio, tipo de deficiencia de membrana o existencia de antecedente neonatal.

Materiales y Métodos

Se evaluaron los datos demográficos, clínicos y de laboratorio correspondientes a todos los individuos estudiados desde 2007 hasta 2015 (n=359): 163 pacientes *de novo*, 64 previamente diagnosticados como ESH (por FOE y AH) y 132 familiares directos sin diagnóstico previo.

Se analizaron los siguientes datos: edad, sexo, tipo de transmisión genética, manifestaciones clínicas al diagnóstico, severidad, eficacia diagnóstica de las pruebas confirmatorias y tipo de deficiencia proteica.

Las pruebas se realizaron según las técnicas previamente descritas (20) (32). En algunos pacientes se utilizaron exclusivamente muestras de sangre capilar. Los criterios diagnósticos para definir ESH fueron:

- visualización de esferocitos en el extendido de sangre periférica,
- al menos dos pruebas confirmatorias positivas.

Los grados de severidad en los pacientes no esplenectomizados se definieron, según criterios de Mariani *et al*, como ESH severa (hemoglobina <8 g/dL), ESH moderada (hemoglobina 8-10 g/dL) y ESH leve (he-

moglobina >10 g/dL) (28). Los familiares sanos con alguna deficiencia de proteína de membrana, pero por lo demás asintomáticos y con las otras pruebas negativas, fueron considerados portadores sanos (PS).

El análisis estadístico fue realizado usando SPSS v11.5. La relación entre resultados de las pruebas y severidad de la enfermedad fue evaluada por métodos no-paramétricos (Kruskall-Wallis). Los resultados se presentan como media \pm desvío estándar o como mediana. Se definió significancia como $p < 0,05$.

El estudio fue aprobado por los Comités de Bioética e Investigación de las instituciones participantes. Se obtuvo consentimiento informado de los controles sanos, los pacientes y los padres (en caso de niños). El estudio fue realizado de acuerdo con la declaración de Helsinki sobre ética en experimentación con seres humanos.

Resultados

Del total de casos analizados se pudieron identificar 174 pacientes con ESH y 22 portadores sanos pertenecientes a 112 familias no relacionadas.

En los pacientes en los cuales se arribó al diagnóstico de ESH, la edad al momento del estudio osciló entre 2 días y 69 años, siendo 107 de ellos (54,6%) menores de 18 años. La edad al diagnóstico inicial también varió entre 2 días y 69 años, correspondiendo a los siguientes grupos etarios (Figura 1): menores de 1 mes 20,0%; 1 a 12 meses 19,3%; 13 meses a 12 años 35,6%; 13 a 18 años, 4,4%; y mayores de 18 años 20,7%. El antecedente de ictericia y/o anemia en periodo neonatal estuvo presente en 104 de 127 pacientes en los que se pudo investigar (81,9%). Se observó una incidencia significativamente mayor de manifestaciones neonatales en las formas moderadas (91,9%) o severas (88,9%) que en las leves (66,1%) ($p < 0,05$). En los grupos familiares en que se pudo realizar el estudio de ambos padres,

se determinó que la transmisión era dominante en 64 (83,1%) y no dominante en 13 familias (16,9%).

DATOS DE LABORATORIO

Las pruebas de CH y 5'EMA-CF se realizaron en todos los pacientes estudiados desde 2007, y la de FOE-CF en todos los estudiados desde 2009. FOE inmediata y diferida y AH se realizaron en todos los pacientes estudiados desde 2007 hasta 2012, y posteriormente solo en aquellos casos que presentaban dudas diagnósticas. La SDS-PAGE se realizó solo en los pacientes estudiados entre 2007 y 2011. El análisis por curvas ROC de las tres pruebas nuevas permitió establecer la alta sensibilidad y especificidad de las mismas y determinar sus valores de corte (Figura 2).

Los porcentajes de positividad de la totalidad de las pruebas realizadas se muestran en la Figura 3. Las que tuvieron mayor sensibilidad fueron CH (92,0%), FOE diferida (91,1%) y 5'EMA-CF (88,5%). La mayoría de los pacientes con ESH presentó 3 o más pruebas positivas; en 40 de ellos (23%) sólo 2 pruebas fueron positivas (Tabla I). Al evaluar los resultados obtenidos únicamente en los 125 pacientes en quienes se realizaron las tres nuevas técnicas (CH, 5'EMA-CF y FOE-CF), se observó que todos habían tenido al menos una prueba positiva, y que en 122 de ellos (97,6%) al menos dos de las pruebas fueron positivas (Tabla II). En pacientes con otras anemias se observaron algunos resultados positivos aislados en las pruebas realizadas, pero en ningún caso en más de una de ellas (Figura 4). La SDS-PAGE fue realizada en 151 individuos, correspondiendo a 96 pacientes y/o familiares en estudio y a 55 controles normales. Se observó que las deficiencias de proteínas de membrana más frecuentemente encontradas en pacientes con ESH fueron ankirina y espectrina (Figura 5). La espectrina fue la deficiencia más frecuente en las formas dominantes.

No se observó diferencia significativa en el resultado de las pruebas de laboratorio entre los subgrupos de severidad (Figura 6) (Tabla III).

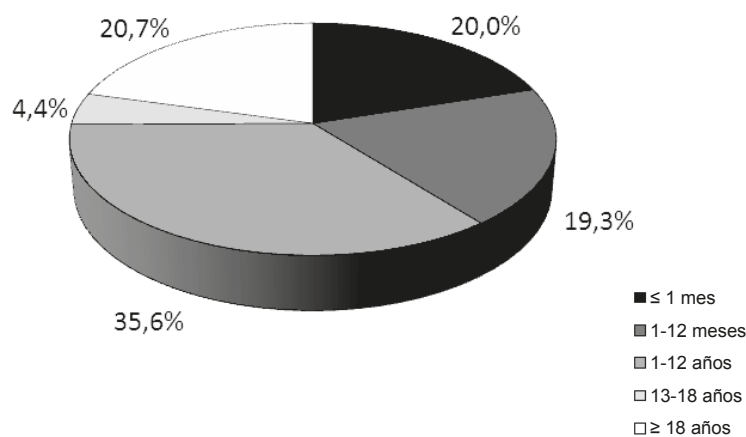
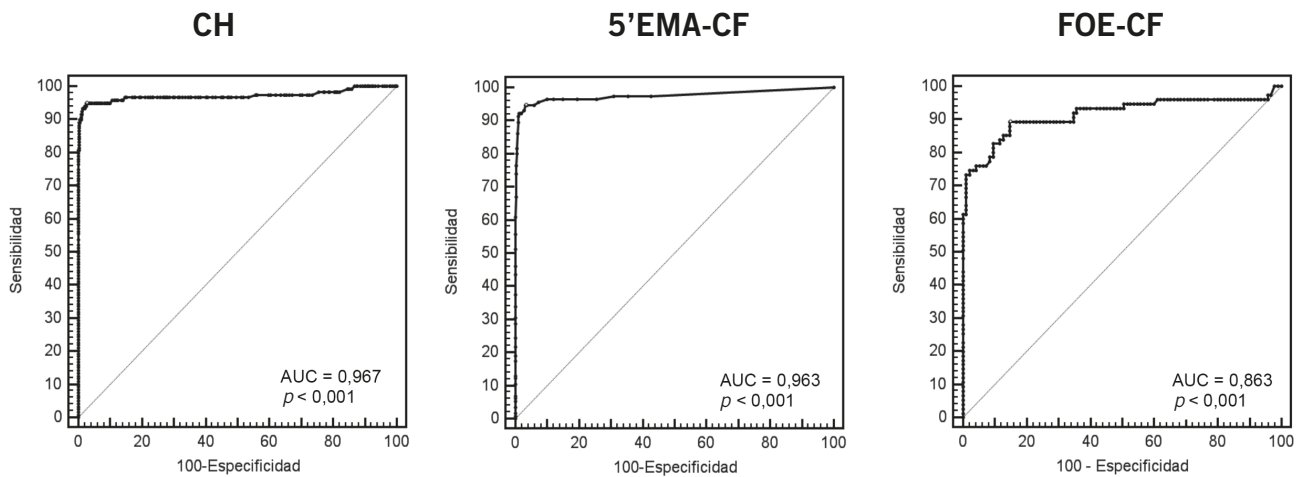


Figura 1. Edad al diagnóstico en pacientes con esferocitosis hereditaria.



	CH	5'EMA-CF	FOE-CF
Controles normales (n)	324	521	107
Pacientes con ESH (n)	121	121	76
Sensibilidad (%)	91,74	85,12	68,42
Especificidad (%)	94,75	97,70	92,52
Valor de corte (%)	>2,8	>17	≤22,8
AUC	0,967	0,963	0,863
CP+	17,48	36,96	9,15
CP-	0,087	0,15	0,34

Figura 2. Especificidad, sensibilidad y valores de corte de las pruebas confirmatorias según curvas ROC. CH: crioheólisis hipertónica; 5'EMA-CF: citometría de flujo con eosina-5'-maleimida; FOE-CF: fragilidad osmótica eritrocitaria por citometría de flujo; ESH: esferecitos hereditaria; AUC: área bajo la curva; CP+: cociente de probabilidad positivo; CP-: cociente de probabilidad negativo.

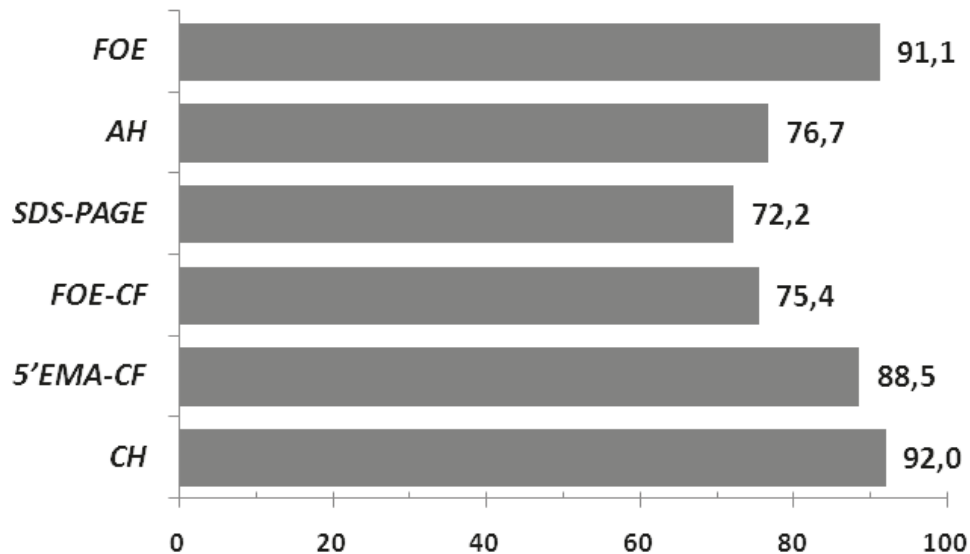


Figura 3. Porcentajes de positividad de las distintas pruebas en pacientes con esferecitos hereditaria. FOE: fragilidad osmótica eritrocitaria; AH: autohemólisis a las 48 h; SDS-PAGE: electroforesis de proteínas de membrana; CH: crioheólisis hipertónica; 5'EMA-CF: citometría de flujo con eosina-5'-maleimida; FOE-CF: fragilidad osmótica eritrocitaria por citometría de flujo; ESH: esferecitos hereditaria.

Tabla I. Cantidad de pruebas positivas en los pacientes con esferocitosis hereditaria.

Cantidad de pruebas positivas	n	%
2	40	23,0
3	68	39,1
4	30	17,2
5	35	20,1
6	1	0,6
Total	174	100,0

Tabla II. Positividad de las tres pruebas nuevas en pacientes con esferocitosis hereditaria.

Cantidad de pruebas positivas	n	%
1	3	2,4
2	30	24,0
3	92	73,6
Total	125	100,0

Discusión y Conclusiones

La ESH ocurre en todos los grupos étnicos y raciales, pero es particularmente frecuente en la población de Europa del norte, con una prevalencia reconocida de 1 en 5.000 personas (19). Sin embargo, dada la frecuencia de formas muy leves de enfermedad que solo se pueden detectar a través de pruebas de laboratorio muy sensibles, se estima que esta prevalencia probablemente sea 4 a 5 veces mayor (33)(34). No hay estimaciones confiables en otras poblaciones, incluso en Argentina, pero su frecuencia parece ser especialmente baja en africanos y en personas del sudeste asiático (8).

Es transmitida en forma autosómica dominante en aproximadamente el 75% de los casos; en el 25% restante ambos padres son hematológicamente normales y las pruebas de laboratorio son normales o solo presentan alteraciones mínimas (21). Estas son las llamadas formas recesivas o no-dominantes. Se supone que en estas familias la transmisión es autosómica recesiva, pero no se puede descartar en forma absoluta la presencia de casos de transmisión autosómica dominante con pe-

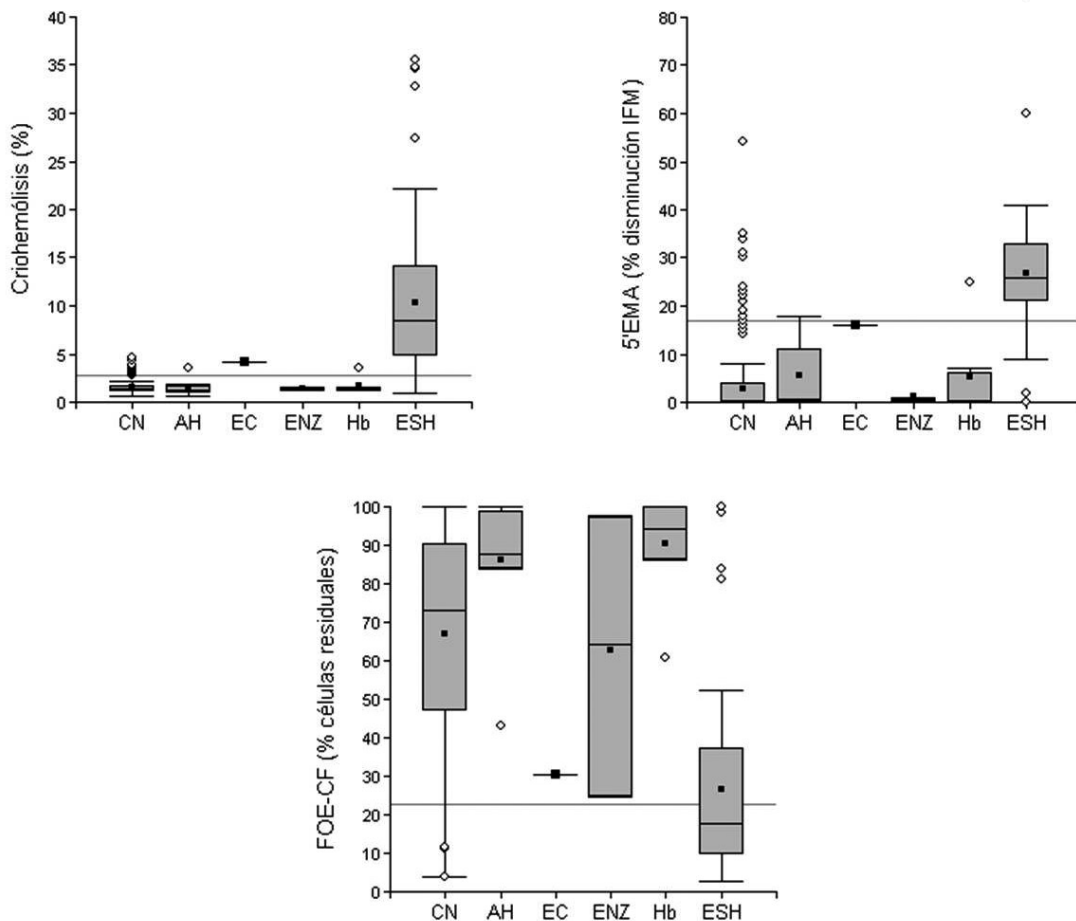


Figura 4. Resultados de las tres pruebas nuevas en otras anemias.

CN: controles normales; AH: otras anemias hemolíticas no esferocíticas; EC: elipticitosis hereditaria; ENZ: enzimopatías; Hb: hemoglobinopatías; ESH: esferocitosis hereditaria.

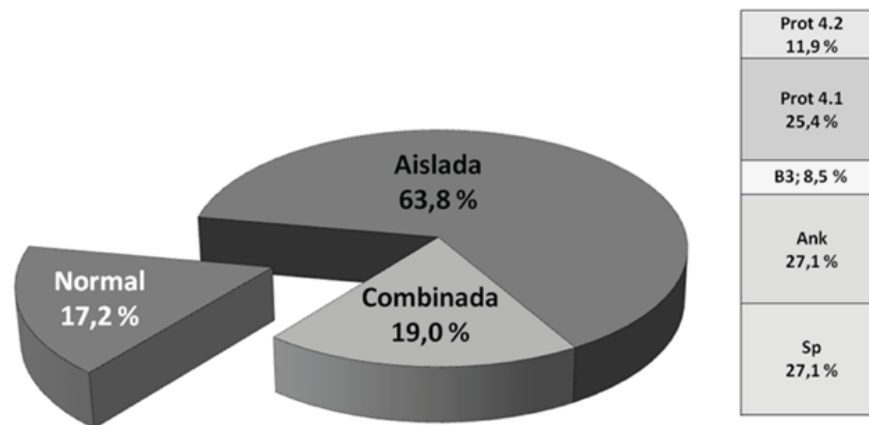


Figura 5. Prevalencia de deficiencias de proteínas de membrana detectadas en los pacientes con esferecitos hereditaria y en portadores sanos. Prot 4.2: proteína 4.2; Prot 4.1: proteína 4.1; B3: Banda 3; Ank: ankirina; Sp: espectrina.

Tabla III. Valores de las pruebas confirmatorias en los distintos subgrupos de severidad.

	AH				
	Media	DE	Mediana	Mín.	Máx.
Leve	5,56	5,67	3,4	0,7	25,1
Moderada	6,57	7,19	4,8	1,2	32,7
Severa	9,28	6,57	7,6	1,8	21,2
Esplenectomizado	7,07	4,62	7,1	1,6	17,8

	FCM basal				
	Media	DE	Mediana	Mín.	Máx.
Leve	0,481	0,040	0,476	0,400	0,654
Moderada	0,496	0,032	0,490	0,460	0,583
Severa	0,492	0,060	0,470	0,428	0,652
Esplenectomizado	0,510	0,026	0,520	0,471	0,557

	FCM diferida				
	Media	DE	Mediana	Mín.	Máx.
Leve	0,610	0,117	0,625	0,292	0,898
Moderada	0,642	0,053	0,629	0,574	0,775
Severa	0,645	0,089	0,619	0,556	0,861
Esplenectomizado	0,779	0,082	0,792	0,586	0,911

	5'EMA-CF				
	Media	DE	Mediana	Mín.	Máx.
Leve	25,61	10,83	26,0	0	49
Moderada	30,63	8,86	32,0	10	49
Severa	27,75	11,10	27,5	2	48
Esplenectomizado	29,84	13,50	29,0	12	85

	CH				
	Media	DE	Mediana	Mín.	Máx.
Leve	11,30	7,93	9,7	1,0	35,5
Moderada	10,99	6,51	10,1	2,4	34,8
Severa	8,92	5,32	8,0	2,9	21,4
Esplenectomizado	7,35	4,62	6,1	0,8	20,2

	FOE-CF				
	Media	DE	Mediana	Mín.	Máx.
Leve	23,41	25,98	13,0	2,4	100,0
Moderada	19,56	18,33	13,0	3,8	71,2
Severa	26,47	26,68	12,8	5,4	83,8
Esplenectomizado	14,53	10,14	11,9	2,6	42,9

AH: autohemólisis; FCM: fragilidad corpuscular media; 5'EMA-CF: eosina-5'-maleimida; CH: criohemólisis hipertónica; FOE-CF: fragilidad osmótica eritrocitaria por citometría de flujo.

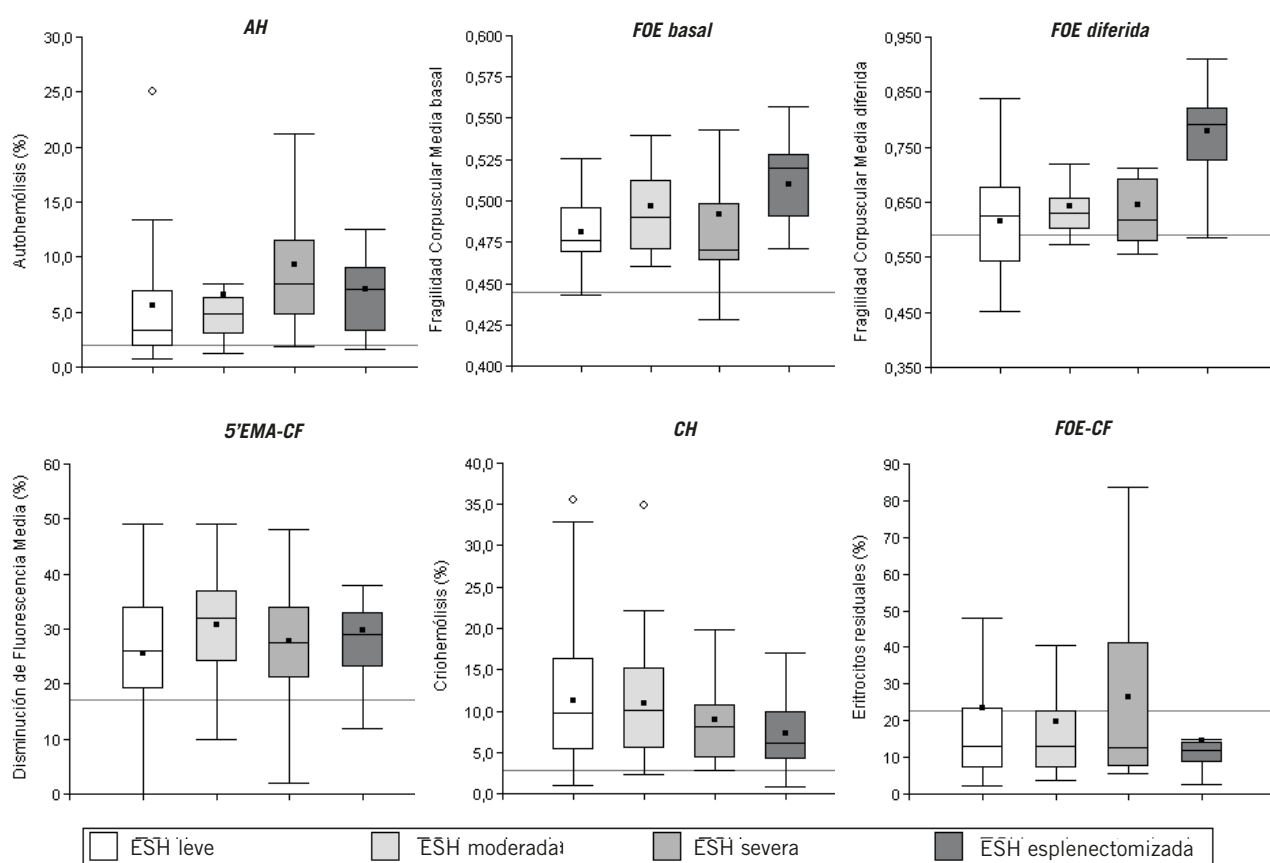


Figura 6. Relación entre resultados de las pruebas de laboratorio y severidad de la anemia. La línea llena dentro del gráfico indica el valor de corte.

ESH: esferocitosis hereditaria; FOE: fragilidad osmótica eritrocitaria; AH: autohemólisis a las 48 h; CH: criohemólisis hipertónica; 5'EMA-CF: citometría de flujo con eosina-5'-maleimida; FOE-CF: fragilidad osmótica eritrocitaria por citometría de flujo.

netrancia reducida; en un 5 a 10% de los pacientes se considera que se trata de una nueva mutación (8) (11) (20-22). Un estudio realizado en Italia demostró que la ocurrencia de mutaciones *de novo* no-dominantes es seis veces más frecuente que para las mutaciones recesivas (22). Nuestros resultados muestran un 83% de formas dominantes, y son coincidentes con los datos publicados en Brasil, México y algunos países europeos (19) (35-38). La asociación entre tipo de transmisión y severidad de la enfermedad es actualmente motivo de controversia. Algunos autores opinan que las formas no dominantes son más severas que las dominantes (21) (29) (38). Sin embargo, en los pacientes estudiados no se pudo demostrar dicha relación, coincidiendo con lo informado por Mariani *et al* en su serie de 300 pacientes (28).

En la población estudiada, al igual que lo generalmente aceptado, la gran mayoría de los casos se diagnosticaron en lactantes o niños (23). En el recién nacido la ictericia es el síntoma más frecuente, presente en más del 90% de los pacientes diagnosticados en esta etapa, asociándose a anemia en 50-80% de los casos (39-41). Se estima que aproximadamente el 50% de los

pacientes a los que se diagnostica ESH presentan como antecedente el haber padecido ictericia neonatal, estando siempre presente el riesgo de *kernicterus* (39) (41-45). Saada *et al* comunicaron que el 1% de los neonatos que requerían luminoterapia padecían ESH (46), y Christensen y Henry recientemente han llamado la atención sobre su subdiagnóstico, postulando que la ESH es una causa significativamente ignorada de hiperbilirrubinemia neonatal (47). El antecedente de ictericia y/o anemia neonatal estuvo presente en casi el 82% de nuestros pacientes, valor superior al 50 - 65% informado por el grupo italiano y otros (27) (28) (41) (42). No tenemos explicación para esta diferencia, pero no puede descartarse la influencia de factores genéticos que determinen un distinto comportamiento de la enfermedad en este periodo de la vida. También llama la atención que en algunos pacientes el diagnóstico recién se haya realizado en la sexta o séptima décadas de la vida. En 3 casos los pacientes, que no tenían diagnóstico previo, eran mayores a 60 años y fueron incorporados al estudio por presentar signos y síntomas de anemia hemolítica (2 casos) o por extensión del estudio al grupo familiar primario.

Esta observación puede estar indicando subestimación o desconocimiento de los síntomas de la enfermedad, así como falta de acceso a las pruebas de laboratorio específicas o bien el avance de la edad pudiera exacerbar las manifestaciones clínicas.

En la actualidad se dispone de varias pruebas confirmatorias para el diagnóstico de ESH. Desde 2007 estos autores vienen evaluando la utilidad de varias de ellas, tanto las clásicas como las más nuevas. Es sabido que ninguna de las pruebas puede detectar el 100% de los pacientes (8) (20-23) (29) (48), y así sucedió también en nuestra serie. La curva de FOE es aún considerada como el "patrón oro" por algunos autores (23) (29) (49), a pesar de no ser útil para diferenciar ESH de otras patologías con esferocitos circulantes, como anemia hemolítica autoinmune (AHAI), incompatibilidad ABO o eliptocitosis hereditaria esferocítica (49-51). Otra limitación que presenta esta prueba es que su interpretación en recién nacidos no es simple, ya que los hematíes fetales presentan menor fragilidad osmótica que los adultos, pero son osmóticamente más sensibles luego de la incubación, por lo que puede dar tanto resultados falsos positivos como negativos. Para evitar este inconveniente, algunos autores postulan el uso de hematíes fetales como control en estos casos (23). De todas formas, el mayor inconveniente para aplicar las pruebas tradicionales en el estudio del recién nacido es el volumen de muestra requerido. En nuestra serie, la FOE tuvo una positividad del 91%, superior a la informada por otros autores (52) (53); consideramos que esto es debido a que para considerar positiva a la prueba evaluamos no solo la fragilidad corpuscular media sino también su gráfica. La SDS-PAGE es una técnica laboriosa que permitió demostrar cuál era la proteína de membrana deficiente en poco más del 70% de nuestros pacientes, porcentaje coincidente con el informado por la mayoría de los autores (21) (35) (54) (55). Su presunta utilidad como marcador de severidad según cuál sea la deficiencia encontrada, no pudo ser confirmada en nuestro estudio, y es actualmente motivo de controversia (20) (37) (56) (57). Por lo tanto, coincidimos con la mayoría de los autores en que no debe utilizarse como prueba de rutina para el diagnóstico de ESH (20) (23) (50). En nuestro caso fue importante para confirmar, sobre un número mayor de casos, los datos recientemente publicados comunicando por primera vez las deficiencias más frecuentemente encontradas en Argentina (22), que corresponden a ankirina y espectrina, coincidente con lo informado en otras poblaciones hispanoamericanas (35) (36) (58). También fue útil para detectar los casos de portadores sanos.

La CH evalúa la hemólisis de los eritrocitos suspendidos en un medio hipertónico a los que se somete a un brusco cambio de temperatura. En estas condiciones, los esferocitos son más susceptibles a la hemólisis que los eritrocitos normales. Como la prueba, a diferencia

de la FOE, no depende de la relación superficie/volumen sino de la integridad de las proteínas de membrana, da resultado normal en la esferocitosis secundaria a AHAI. Si bien hay opiniones controvertidas respecto a su utilidad (20) (23) (29) (50) (59-61), en este estudio fue la prueba con mayor índice de positividad (91%) y con una especificidad de 94,8%. La 5'EMA-CF evalúa la intensidad de fluorescencia emitida por el reactivo eosina-5'-maleimida, que interacciona covalentemente con las proteínas de la membrana, en especial banda 3 (51). En la ESH, cualquiera sea la proteína deficiente primaria, se obtiene una disminución de la fluorescencia debido a la pérdida de membrana que contiene las proteínas que reaccionan con el reactivo fluorescente. En otras anemias hemolíticas la fluorescencia emitida es normal, por lo que esta prueba también permite diferenciar los esferocitos de la ESH de aquellos presentes en otras patologías. Los resultados se informan como porcentaje de disminución de la intensidad de fluorescencia respecto del promedio obtenido para seis controles normales procesados simultáneamente y que posean el mismo tiempo de almacenamiento que la muestra a estudiar (20) (62). En nuestra serie dio positiva en el 88,5% de los casos, por lo que fue, junto con la CH, una de las pruebas con mayor positividad. Nuestros resultados coinciden con la alta especificidad (96-99%) y sensibilidad (89-97%) informada por otros autores (51) (63-66). Otra ventaja que presenta esta prueba y que ayuda a simplificar la metodología de estudio es que la adquisición de los datos puede ser realizada hasta 24 horas después de procesada la muestra sin que los resultados sean afectados (69). La FOE-CF cuantifica los eritrocitos resistentes a la hemólisis que se generan por el agregado de agua a una suspensión de hematíes en solución fisiológica. El número de eritrocitos suspendidos se determina por citometría de flujo en tiempo real antes y después del agregado de agua (70). Nuestro índice de positividad para un valor de corte $\leq 50,5\%$ de células residuales fue de 88%, coincidente con lo informado por otros autores (70) (71). Mediante el análisis de curvas ROC pudo establecerse que valores de corte más bajos incrementan la especificidad de la prueba, equiparándola con la obtenida para CH y 5'EMA-CF: para un valor de corte $\leq 22,8\%$, la sensibilidad fue de 68,4% y la especificidad de 92,5%.

Uno de los objetivos al comenzar a evaluar nuevas técnicas diagnósticas era establecer si algunas de ellas, asociadas o no a las tradicionales, podían simplificar la metodología de estudio alcanzando a la vez mayor sensibilidad y especificidad. En un estudio anterior estos autores habían comunicado que alguna de las dos pruebas nuevas (CH y 5'EMA-CF) era positiva en el 93,5% de los pacientes con ESH (22). Esta observación se corresponde con la opinión de Bolton-Maggs *et al*, que recomiendan a ambas como las pruebas diagnósticas más útiles (50) (72). Con la incorporación de la FOE-CF a

esta asociación se logró que en el 100% de los casos al menos una prueba fuera positiva. Se observó, además, que con esta triple asociación se pudieron cumplir los criterios diagnósticos para ESH-2 pruebas positivas en el 97,6% de estos pacientes. Estas tres son pruebas de realización sencilla, que además permiten alcanzar resultados en el mismo día de la extracción. Pueden realizarse tanto con sangre venosa como capilar (32) (73-75), por lo que requieren un volumen de muestra muy pequeño, facilitando un diagnóstico más precoz en neonatos y lactantes pequeños. En Argentina no se han comunicado hasta la fecha otras experiencias con el uso de estas tres pruebas. A la luz de estos resultados, estos autores consideran que con la realización rutinaria en forma simultánea de CH, 5'EMA-CF y FOE-CF se puede llegar al diagnóstico de ESH sin necesidad de realizar las tradicionales pruebas de FOE y AH. Solo en menos del 3% de los casos se requerirá de la realización de pruebas adicionales para confirmar el diagnóstico.

Las conclusiones más importantes de este estudio fueron:

- a) En los pacientes con ESH en Argentina y en coincidencia con otras poblaciones latinoamericanas, las principales deficiencias proteicas encontradas fueron ankirina y espectrina.
- b) La realización simultánea de CH, 5'EMA-CF y FOE-CF permite diagnosticar más del 97% de los casos, pudiendo reemplazar a las pruebas convencionales (FOE, AH, SDS-PAGE), cuya realización debería quedar limitada a aquellos casos con fuerte sospecha diagnóstica pero que no pudieron ser confirmados por las tres nuevas pruebas.
- c) El grado de alteración de las pruebas diagnósticas no logra predecir el subgrupo de severidad clínica.
- d) En Argentina la incidencia de manifestaciones de la enfermedad en periodo neonatal parece ser mayor que en otras poblaciones.

CORRESPONDENCIA

Dra. RENÉE LEONOR CRISP
Hospital Posadas
Av. Marconi y Pte. Illia. EL PALOMAR
CP 1684. Buenos Aires, Argentina
Teléfono: (011) 4469-9300, interno 1114

Referencias bibliográficas

1. Minkowski O. Über eine hereditäre, unter dem bilde eines chronischen ikterus mit urobilinurie, splenomegalie und nierensiderosis verlaufende affektion. *Verh Dtsch Kongr Med* 1900; 18: 316-25.
2. Chauffard MA. Pathogenie de l'ictère congénital de l'adulte. *Semaine Med (Paris)* 1907; 27: 25-30.
3. Donato H, Crisp R, Rapetti MC. Anemias hemolíticas hereditarias por trastornos de membrana. En: *Anemias en Pediatría*. Donato H, Rapetti MC, Crisp RL, editores. Buenos Aires: Journal; 2013. p.105-34.
4. Comité Nacional de Hematología: Donato H, Crisp RL, Rapetti MC, García E, Attie M. Esferocitosis hereditaria. Revisión. Parte I. Historia, demografía, etiopatogenia y diagnóstico. *Arch Argent Pediatr* 2015; 113: 69-80.
5. Liu SC, Derick LH, Agre P, Palek J. Alteration of the erythrocyte membrane skeletal ultrastructure in hereditary spherocytosis, hereditary elliptocytosis, and pyropoikilocytosis. *Blood* 1990; 76: 198-205.
6. Delaunay J, Alloisio N, Morle L, Baklouti F, Dalla Venezia N, Maillat P, *et al.* Molecular genetics of hereditary elliptocytosis and hereditary spherocytosis. *Ann Genet* 1996; 39: 209-21.
7. Tse WT, Lux SE. Red blood cell membrane disorders. *Br J Haematol* 1999; 104: 2-13.
8. Gallagher PG. Disorders of erythrocyte metabolism and shape. En: *Hematologic Problems of the Neonate*. Christensen RD, editor. Philadelphia: WB Saunders; 2000. p. 209-43.
9. Chen T, Weiss L. The role of the sinus wall in the passage of erythrocytes through the spleen. *Blood* 1973; 41: 529-37.
10. Weiss L, Tavassoli M. Anatomical hazards to the passage of erythrocytes through the spleen. *Semin Hematol* 1970; 7: 372-80.
11. Glader B, Allen G. Neonatal hemolysis. En: *Neonatal Hematology*. de Alarcón P, Werner E, editors. Cambridge: Cambridge University Press; 2005. p. 132-62.
12. Lux SE, Palek J. Disorders of the red cell membrane. En: *Blood: Principles and Practice of Hematology*. Handin RI, Stossel TP, Lux SE, editors. Philadelphia: JB Lippincot; 1995. p. 1701-65.
13. Ferrant A, Leners N, Michaux JL, Verwilghen RL, Sokal G. The spleen and haemolysis: Evaluation of the intrasplenic transit time. *Br J Haematol* 1987; 65: 31-4.
14. Mayman D, Zipursky A. Hereditary spherocytosis: the metabolism of erythrocytes in the peripheral blood and in the splenic pulp. *Br J Haematol* 1974; 27: 201-17.
15. Lusher JM, Barnhart MI. The role of the spleen in the pathophysiology of hereditary spherocytosis and hereditary elliptocytosis. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1980; 2: 31-5.
16. Myhre Jensen O, Kristensen J. Red pulp of the spleen in autoimmune haemolytic anaemia and hereditary spherocytosis: morphometric light and electron microscopy studies. *Scand J Haematol* 1986; 36: 263-6.
17. Palek J, Jarolim P. Clinical expression and laboratory detection of red blood cell membrane protein mutations. *Semin Hematol* 1993; 30: 249-83.
18. Pivkin IV, Peng Z, Karniadakis GE, Buffet PA, Dao M, Suresh S. Biomechanics of red blood cells in human spleen and consequences for physiology and disease. *PNAS* 2016; 113: 7804-9.

19. Morton NE, MacKinney AA, Kosowes N, Schilling RF, Gray MP. Genetics of spherocytosis. *Am J Hum Genet* 1962; 14: 170-84.
20. Crisp RL, Solari L, Vota D, García E, Miguez G, Chamorro ME, *et al.* A prospective study to assess the predictive value for hereditary spherocytosis using five laboratory tests (cryohemolysis test, eosin-5'-maleimide flow cytometry, osmotic fragility test, autohemolysis test, and SDS-PAGE) on 50 hereditary spherocytosis families in Argentina. *Ann Hematol* 2011; 90: 625-34.
21. Stevens RF, Evans DIK. Congenital spherocytosis is often not hereditary. *Clin Pediatr* 1981; 20: 47-9.
22. Miraglia del Giudice E, Nobili B, Francese M, D'Urso L, Iolascon A, Eber S, *et al.* Clinical and molecular evaluation of non-dominant hereditary spherocytosis. *Br J Haematol* 2001; 112: 42-7.
23. Lux SE. Disorders of the red cell membrane. En: *Hematology of Infancy and Childhood*. Orkin SH, Fisher DE, Ginsburg D, Thomas Look A, Lux SE, Nathan DG, editors. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2015. p. 515-79.
24. Crisp R, Vota D, Donato H, García E, Rapetti MC, Maltaner R, *et al.* Eryptosis is induced by hyperthermia in hereditary spherocytosis red blood cells. *Clin Chem Lab Med* 2016; 54: e165-8.
25. Packman CH. The spherocytic haemolytic anaemias. *Br J Haematol* 2001; 112: 888-99.
26. Hassoun H, Palek J. Hereditary spherocytosis: a review of the clinical and molecular aspects of the disease. *Blood Rev* 1996; 10: 129-47.
27. Gallagher PG. Red cell membrane disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005, p.13-26.
28. Mariani M, Barcellini W, Vercellati C, Marcello AP, Fermo E, Pedotti P, *et al.* Clinical and hematologic features of 300 patients affected by hereditary spherocytosis grouped according to the type of the membrane protein defect. *Haematologica* 2008; 93: 1310-7.
29. Iolascon A, Avvisati RA. Genotype/phenotype correlation in hereditary spherocytosis. *Haematologica* 2008; 93: 1283-8.
30. King MJ, Telfer P, MacKinnon H, Langabeer L, McMahon C, Darbyshire P, *et al.* Using the eosin-5-maleimide binding test in the differential diagnosis of hereditary spherocytosis and hereditary pyropoikilocytosis. *Cytometry Part B* 2008; 74B: 244-50.
31. King MJ, Zanella A. Hereditary red cell membrane disorders and laboratory diagnostic testing. *Int J Lab Hematol* 2013; 35: 237-43.
32. Crisp RL, Solari L, Gammella D, Schwartzman GA, Rapetti MC, Donato H. Use of capillary blood to diagnose hereditary spherocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 2012; 59: 1299-301.
33. Godal HC, Heist H. High prevalence of increased osmotic fragility of red blood cells among Norwegian donors. *Scand J Haematol* 1981; 27: 30-4.
34. Eber SW, Pekrun A, Neufeldt A, Schroter W. Prevalence of increased osmotic fragility of erythrocytes in German blood donors: Screening using a modified glycerol lysis test. *Ann Hematol* 1992; 64: 88-92.
35. Sánchez-López JY, Camacho AL, Magaña MT, Ibarra B, Perea FJ. Red cell membrane protein deficiencies in Mexican patients with hereditary spherocytosis. *Blood Cells Mol Dis* 2003; 31: 357-9.
36. Saad ST, Costa FF, Vicentin DL, Salles TS, Pranke PH. Red cell membrane protein abnormalities in hereditary spherocytosis in Brazil. *Br J Haematol* 1994; 88: 295-9.
37. Agre P, Asimos A, Casella JF, McMillan C. Inheritance pattern and clinical response to splenectomy as a reflection of erythrocyte spectrin deficiency in hereditary spherocytosis. *N Engl J Med* 1986; 315: 1579-83.
38. Eber SW, Armbrust R, Schröter W. Variable clinical severity of hereditary spherocytosis: relation to erythrocyte spectrin concentration, osmotic fragility and autohemolysis. *J Pediatr* 1990; 117: 409-16.
39. Burman D. Congenital spherocytosis in infancy. *Arch Dis Child* 1958; 33: 335-51.
40. Trucco JI, Brown AK. Neonatal manifestations of hereditary spherocytosis. *Am J Dis Child* 1967; 113: 263-70.
41. Schröter W, Kashnitz E. Diagnosis of hereditary spherocytosis in newborn infants. *J Pediatr* 1983; 103: 460-6.
42. Stamey CC, Diamond LK. Congenital hemolytic anemia in the newborn. *Am J Dis Child* 1957; 94: 616-24.
43. Pinto L, Iolascon A, Miraglia del Giudice E. The Italian pediatric survey on hereditary spherocytosis. *Int J Pediatr Hematol Oncol* 1995; 2: 43-7.
44. Berardi A, Lugli L, Ferrari F, Gargano G, D'Apolito M, Marrone A, *et al.* Kernicterus associated with hereditary spherocytosis and UGT1A1 promoter polymorphism. *Biol Neonat* 2006; 90: 243-6.
45. Sgro M, Campbell D, Shah V. Incidence and causes of severe neonatal hyperbilirubinemia in Canada. *CMAJ* 2006; 175: 587-90.
46. Saada V, Cynober T, Brossard Y, Schischmanoff PO, Sender A, Cohen H, *et al.* Incidence of hereditary spherocytosis in a population of jaundiced neonates. *Pediatr Hematol Oncol* 2006; 23: 387-97.
47. Christensen RD, Henry E. Hereditary spherocytosis in neonates with hyperbilirubinemia. *Pediatrics* 2010; 125: 120-5.
48. Bianchi P, Fermo E, Vercellati C, Marcello AP, Porretti L, Cortelezzi A, *et al.* Diagnostic power of laboratory tests for hereditary spherocytosis: a comparison study in 150 patients grouped according to molecular and clinical characteristics. *Haematologica* 2012; 97: 516-23.
49. Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N. Hereditary spherocytosis. *Lancet* 2008; 372: 1411-26.
50. Bolton-Maggs PHB, Stevens RF, Dodd NJ, Lamont G, Tittensor P, On behalf of the General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis. *Br J Haematol* 2004; 126: 455-74.
51. King MJ, Behrens J, Rogers C, Flynn C, Greenwood D, Chambers K. Rapid flow cytometric test for the diagnosis of membrane cytoskeleton-associated haemolytic anaemia. *Br J Haematol* 2000; 111: 924-33.

52. Dacie JV, Lewis SM, Luzzato L. Investigation of the hereditary haemolytic anaemias: membrane and enzyme abnormalities. En: Practical Haematology. Dacie JV, Lewis SM, editors. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1991. p. 195-236.
53. Korones D, Pearson HA. Normal erythrocyte osmotic fragility in hereditary spherocytosis. *J Pediatr* 1989; 114: 264-6.
54. Yawata Y, Kanzaki A, Yawata A, Doerfler W, Ozcan R, Eber SW. Characteristic features of the genotype and phenotype of hereditary spherocytosis in the Japanese population. *Int J Hematol* 2000; 7: 118-35.
55. Lee YK, Cho HI, Park SS, Lee YJ, Ra E, Chang YH, *et al.* Abnormalities of erythrocyte membrane proteins in Korean patients with hereditary spherocytosis. *J Korean Med Sci* 2000; 15: 284-8.
56. Jarolim P, Murray JL, Rubin HL, Taylor WM, Prchal JT, Ballas SK, *et al.* Characterization of 13 novel band 3 gene defects in hereditary spherocytosis with band 3 deficiency. *Blood* 1996; 88: 4366-74.
57. Nakanishi H, Kanzaki A, Yawata A, Yamada O, Yawata Y. Ankyrin gene mutations in Japanese patients with hereditary spherocytosis. *Int J Hematol* 2001; 73: 54-63.
58. Ricard MP, Gilsanz F, Millan I. Erythroid membrane protein defects in hereditary spherocytosis. A study of 62 Spanish cases. *Haematologica* 2000; 85: 994-5.
59. Streichman S, Gescheidt Y. Cryohemolysis for the detection of hereditary spherocytosis: correlation studies with osmotic fragility and autohemolysis. *Am J Hematol* 1998; 58: 206-12.
60. Romero RR, Poo JL, Robles JA, Uriostegui A, Vargas F, Majluf-Cruz A. Usefulness of cryohemolysis test in the diagnosis of hereditary spherocytosis. *Arch Med Res* 1997; 28: 247-51.
61. Iglauer A, Reinhardt D, Schröter W, Pekrun A. Cryohemolysis test as a diagnostic tool for hereditary spherocytosis. *Ann Hematol* 1999; 78: 555-7.
62. Hunt L, Greenwood D, Heimpel H, Noel N, Whiteway A, King MJ. Toward the harmonization of result presentation for the eosin-5-maleimide binding test in the diagnosis of hereditary spherocytosis. *Cytometry Part B* 2015; 88B: 50-7.
63. Stoya G, Gruhn B, Vogelsang H, Baumann E, Linss W. Flow cytometry as a diagnostic tool for hereditary spherocytosis. *Acta Haematol* 2006; 116: 186-91.
64. Tachavanich K, Tanphaichitr VS, Utto W, Viprakasit V. Rapid flow cytometric test using eosin-5-maleimide for diagnosis of red blood cell membrane disorders. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2009; 40: 570-4.
65. Girodon F, Garçon L, Bergoin E, Largier M, Delaunay J, Feneant-Thibault M, *et al.* Usefulness of the eosin-5'-maleimide cytometric method as a first-line screening test for the diagnosis of hereditary spherocytosis: comparison with ektacytometry and protein electrophoresis. *Br J Haematol* 2008; 468-70.
66. Kar R, Rao S, Srinivas UM, Mishra P, Pati HP. Clinical-hematological profile of hereditary spherocytosis: experience from a tertiary care center in North India. *Hematology* 2009; 14: 164-7.
67. Mackiewicz G, Bailly F, Favre B, Guy J, Maynadié M, Girodon F. Flow cytometry test for hereditary spherocytosis. *Haematologica* 2012; 97: e47.
68. El Gendy W, Hassab HM, Ghanem AM, Lewis IM, Nawar SM. The application of eosin maleimide-binding test in the diagnosis of hereditary spherocytosis among undiagnosed cases of chronic hemolytic anemia in children. *Egypt J Haematol* 2014; 39: 109-13.
69. Ciepiela O, Kotula I, Gorska E, Stelmszczyk-Emmel A, Popko K, Szmydki-Baran A, *et al.* Delay in the measurement of eosin-5'-maleimide (EMA) binding does not affect the test results for the diagnosis of hereditary spherocytosis. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51: 817-23.
70. Won DI, Suh JS. Flow cytometric detection of erythrocyte osmotic fragility. *Cytometry Part B* 2009; 76B: 135-41.
71. Warang P, Gupta M, Kedar P, Ghosh K, Colah R. Flow cytometric osmotic fragility - An effective screening approach for red cell membranopathies. *Cytometry Part B* 2011; 80B: 186-90.
72. Bolton-Maggs PH, Langer JC, Iolascon A, Tittensor P, Kings MJ. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis - 2011 update. *Br J Haematol* 2012; 156: 37-49.
73. Crisp R, Solari L, Gammella D, Schwartzman G, Alfonso G, Donato H. Flow cytometric osmotic fragility (FC-OF) can replace the traditional osmotic fragility (OF) test? Preliminary results. *Haematologica* 2010; 95: 703 (abs 1816).
74. Crisp R, Solari L, Gammella D, Schwartzman G, Alfonso G, Donato H. Use of capillary blood to perform the eosin-5'-maleimide flow cytometry (EMA-FC) test: Results are comparable to venous blood. *Haematologica* 2010; 95: 700 (abs 1808).
75. Crisp RL, Gammella D, Solari L, Rapetti MC, Schwartzman G, Donato H. Utilización de sangre capilar: Un aporte para el diagnóstico precoz de esferocitosis hereditaria. *Hematología* 2013; 17: 8-14.

Recibido: 23 de julio de 2016

Aceptado: 29 de marzo de 2017