

Utilización de sangre capilar. Un aporte para el diagnóstico precoz de esferocitosis hereditaria

Crisp RL^{1,3}, Gammella D⁴, Solari L⁴, Rapetti MC⁵,
Schvartzman G³, Donato H^{3,5}

¹División Hematología Clínica, Departamento de Medicina, Hospital Nacional Alejandro Posadas, Buenos Aires; ²Laboratorio de Análisis Biológicos, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires; ³Consultorios de Hematología Infantil, Buenos Aires; ⁴Laboratorio de Citometría, Departamento de Diagnóstico, Hospital Nacional Alejandro Posadas, Buenos Aires; ⁵Sección Hematología/Oncología, Hospital Municipal del Niño de San Justo, Buenos Aires.

E-mail: reneecrisp@gmail.com

Fecha de recepción: 15/10/2012
Fecha de aprobación: 10/02/2013



ARTÍCULO
ORIGINAL

HEMATOLOGIA, Vol. 17 N° 1: 8-14
Enero-Abril, 2013

RESUMEN

Estudiamos 40 niños que presentaban sintomatología de anemia hemolítica o tenían historia familiar positiva para esferocitosis hereditaria, con el objetivo de evaluar la utilidad de muestras de sangre capilar para realizar las pruebas confirmatorias. Se diagnosticó esferocitosis hereditaria en 24 casos. La positividad de las pruebas en estos pacientes fue de 96% para criohemólisis hipertónica, 92% para citometría de flujo con eosina-5' maleimida y 86% para fragilidad osmótica eritrocitaria por citometría de flujo. La mayoría de los pacientes tuvo resultados positivos para todas las pruebas realizadas. Solo 6 de ellos presentaron resultado normal en una de las pruebas: 2 para citometría de flujo con eosina-5' maleimida, 1 para criohemólisis y 3 para fragilidad osmótica por citometría de flujo. El uso de sangre capilar demostró ser útil para el diagnóstico. La realización simultánea de estas tres pruebas permitió confirmar el diagnóstico en el 100% de los pacientes. El uso de muy pequeños volúmenes de sangre (300 µL) permite un diagnóstico etiológico más precoz en neonatos y lactantes pequeños.

Palabras clave: esferocitosis hereditaria, criohemólisis hipertónica, citometría de flujo, anemia neonatal, fragilidad osmótica

ABSTRACT

Use of capillary blood. An aid for early diagnosis of hereditary spherocytosis

We studied 40 children with hemolytic anemia, or with positive family history for hereditary spherocytosis, to assess the reliability of capillary blood samples for diagnosis. Hereditary spherocytosis was diagnosed in 24 patients. Hypertonic cryohemolysis was positive in 94%, eosin-5'-maleimide flow cytometry in 90%, and flow cytometric osmotic fragility in 94% of them. Most patients with hereditary spherocytosis were positive for all performed tests. Only 6 of them presented one normal result: 2 for eosin-5'-maleimide flow cytometry, 1 for cryohemolysis test, and 3 for flow cytometric osmotic fragility. Capillary blood sampling showed to be useful for the diagnosis. Simultaneous use of these three tests allows confirming diagnosis in 100% of patients. The use of very small blood volumes (300 µL) allows an earlier etiological diagnosis in neonates and small infants.

Key words: hereditary spherocytosis, hypertonic cryohemolysis, flow cytometry, neonatal anemia, osmotic fragility

INTRODUCCIÓN

La esferocitosis hereditaria (ESH) es una anemia hemolítica causada por defectos cuali o cuantitativos en las proteínas de membrana, especialmente aquellas con interacciones verticales que conectan el esqueleto de la membrana a la bicapa lipídica. Las deficiencias más frecuentemente observadas en nuestro país corresponden a ankirina y espectrina¹,

al igual que en otras poblaciones hispanoamericanas²⁻⁴. Es la anemia hereditaria más frecuente, luego de la beta talasemia heterocigota, en la población argentina. La intensidad de sus manifestaciones clínicas es muy amplia, pudiendo variar desde pacientes asintomáticos a otros con anemia severa dependiente de transfusiones.⁵ La ESH típica no presenta mayores problemas para el diagnóstico. En la mayoría de los casos la asociación de historia familiar positiva, hallazgos del examen físico (p. ej., esplenomegalia, ictericia), evidencia de laboratorio de hemólisis extravascular, observación de esferocitos en el extendido de sangre periférica y prueba de Coombs directa negativa confirman el diagnóstico⁵⁻⁸. Sin embargo, en muchos pacientes el diagnóstico puede ser difícil por varias razones: se pueden observar esferocitos en otras anemias hemolíticas⁵, la historia familiar es negativa en 25-30% de los pacientes^{1,5,9} y las distintas pruebas diagnósticas confirmatorias tienen especificidad y sensibilidad muy variables^{1,5,7,10,11}. La ESH leve puede ser difícil de diagnosticar porque los pacientes suelen tener niveles de hemoglobina y bilirrubina normales y cantidad mínima, o aun ausencia total, de esferocitos en sangre periférica^{1,5}. En la ESH severa pueden observarse, además de los esferocitos, otras alteraciones morfológicas de los glóbulos rojos (acantocitos, equinocitos, poiquilocitos, estomatocitos, etc.), que vuelven imperativo el diagnóstico diferencial con otras anemias hemolíticas⁵. El recién nacido y el lactante presentan una problemática especial. En ellos puede ser difícil, y aun imposible, tomar muestras con la cantidad de sangre necesaria para realizar las pruebas confirmatorias habituales, ya sea por las dificultades prácticas inherentes a la toma de la muestra o por la inconveniencia de extraer grandes volúmenes de sangre en niños pequeños. Además, si presentan hemólisis severa que requiera transfusiones o exsanguineotransfusiones, la realización de las pruebas confirmatorias debe ser postergada por 2-3 meses. En consecuencia, el diagnóstico etiológico de la anemia hemolítica puede retardarse semanas o meses.

Considerando que la obtención de muestras de sangre capilar es un procedimiento sencillo, y ante la ausencia de publicaciones previas al respecto, decidimos investigar su utilidad para realizar las pruebas de laboratorio confirmatorias de ESH. Así, recientemente hemos comunicado que la utilización simultánea de tres pruebas permite llegar al diagnóstico en el 100% de los casos¹². En este trabajo damos a conocer los resultados actualizados obtenidos hasta la fecha con esta metodología de estudio.

PACIENTES Y MÉTODOS

Los criterios de inclusión para el protocolo de estudio fueron: a) presentar signos y síntomas de anemia hemolítica; o, b) tener un familiar directo (progenitor o hermano) con diagnóstico previo de ESH. Se definió anemia hemolítica como nivel de hemoglobina por debajo del límite inferior normal para la edad, asociado a recuento reticulocitario y nivel de bilirrubina por encima de los límites superiores normales para la edad. Las muestras de sangre se recolectaron por punción digital o de talón en tubos de microhematocrito heparinizados. Se tomaron 6 tubos por paciente para realizar todas las pruebas (300 µL). Se realizaron las siguientes pruebas: criohemólisis hipertónica (CH), citometría de flujo con eosina-5' maleimida (5'EMA-CF) y fragilidad osmótica eritrocitaria por citometría de flujo (FOE-CF). La CH y la 5'EMA-CF fueron procesadas según las técnicas previamente descritas¹. La FOE-CF fue realizada de acuerdo al método desarrollado por Won y Suh.¹³ En nuestro laboratorio, los valores de corte de referencia para el diagnóstico de ESH son los siguientes: CH > 2,8%; 5'EMA-CF: disminución de intensidad de fluorescencia media (gmean) >17%; y FOE-CF < 22,8% de células rojas residuales. Los extendidos de sangre periférica fueron examinados independientemente por dos expertos (RLC y HD). Todas las pruebas fueron realizadas dentro de las 24 horas de obtenida la muestra. LA FOE-CF no fue realizada en todos los pacientes por haber sido desarrollada en nuestro laboratorio posteriormente a las otras dos pruebas. Los criterios utilizados para confirmar el diagnóstico de ESH fueron: a) visualización de esferocitos en el extendido de sangre periférica; y, b) resultado positivo en por lo menos dos de las pruebas de laboratorio.

RESULTADOS

Se estudiaron 40 niños, de 2 días a 7 años de edad (mediana: 5 meses); 9 de ellos eran menores de 1 mes de vida (Tabla 1). En la Figura 1 se muestra la distribución de los motivos de estudio y en la Figura 2 la de los diagnósticos definitivos de la población estudiada. Se diagnosticó ESH en 24 casos. La CH y la 5'EMA-CF se realizaron en todos los niños, y la FOE-CF en 36 de ellos. La CH fue positiva en 23 (96%) y la 5'EMA-CF en 22 (92%) pacientes con ESH, mientras que la FOE-CF fue positiva en 19 de 22 niños (86%) con ESH en quienes se realizó la prueba (Figura 3). El

TABLA 1.- Datos de los sujetos estudiados

Edad	Motivo de estudio	5'EMA-CF ↓Gmean	CH (%)	FOE-CF (% células residuales)	# De pruebas Positivas	Diagnóstico
9 m	Anemia hemolítica neonatal	9	4,78	7,9	2/3	Esferocitosis hereditaria
4 m	Anemia hemolítica neonatal + Antecedente familiar	29	15,48	NR	2/2	Esferocitosis hereditaria
22 m	Anemia hemolítica neonatal	20	4,55	9,2	3/3	Esferocitosis hereditaria
21 m	Anemia hemolítica neonatal + Antecedente familiar	39	10,37	4,0	3/3	Esferocitosis hereditaria
1 m	Anemia hemolítica neonatal	19	8,45	NR	2/2	Esferocitosis hereditaria
3 m	Anemia hemolítica	29	11,25	7,5	3/3	Esferocitosis hereditaria
20 m	Anemia hemolítica + Antecedente familiar	49	9,38	4,2	3/3	Esferocitosis hereditaria
10 m	Anemia hemolítica neonatal + Antecedente familiar	48	21,35	5,4	3/3	Esferocitosis hereditaria
4 a	Anemia hemolítica	0	2,28	62,9	0/3	Anemia hemolítica no esferocítica
1 m	Anemia hemolítica neonatal	16	1,90	99,0	0/3	Anemia hemolítica no esferocítica
3 m	Anemia hemolítica + Antecedente familiar	47	18,50	5,8	3/3	Esferocitosis hereditaria
14 d	Anemia hemolítica neonatal	0	2,80	67,8	0/3	Anemia hemolítica no esferocítica
3 a	Anemia hemolítica + Antecedente familiar	24	1,96	15,7	2/3	Esferocitosis hereditaria
2 m	Anemia hemolítica + Antecedente familiar	25	5,11	9,8	3/3	Esferocitosis hereditaria
4 m	Anemia hemolítica neonatal	5	0,83	NR	0/2	Anemia hemolítica no esferocítica
18 m	Antecedente familiar	11	0,71	NR	0/2	Normal
1 m	Anemia hemolítica neonatal	16	1,10	84,2	0/3	Anemia hemolítica no esferocítica
15 d	Anemia hemolítica neonatal	1	3,47	43,0	1/3	Incompatibilidad ABO
6 a	Anemia hemolítica	38	17,36	7,1	3/3	Esferocitosis hereditaria
3 m	Antecedente familiar	15	0,89	32,8	0/3	Normal
6 m	Anemia hemolítica neonatal	11	1,25	87,8	0/3	Anemia hemolítica no esferocítica
6 m	Anemia hemolítica neonatal	11	1,61	94,9	0/3	Anemia hemolítica no esferocítica
2 d	Anemia hemolítica neonatal	25	4,15	20,3	3/3	Esferocitosis hereditaria
12 m	Antecedente familiar	32	5,32	3,6	3/3	Esferocitosis hereditaria
3 m	Anemia hemolítica neonatal	28	4,31	8,6	3/3	Esferocitosis hereditaria
7 a	Anemia hemolítica	31	14,77	21,3	3/3	Esferocitosis hereditaria
3 a	Antecedente familiar	5	1,17	100,0	0/3	Normal
2 a	Anemia hemolítica	34	8,42	13,0	3/3	Esferocitosis hereditaria
2 a	Anemia hemolítica	37	5,16	18,7	3/3	Esferocitosis hereditaria
2 m	Anemia hemolítica neonatal	25	3,67	56,9	2/3	Esferocitosis hereditaria
4 a	Anemia hemolítica	3	18,52	21,3	2/3	Esferocitosis hereditaria
4 m	Anemia hemolítica neonatal	1	1,28	95,7	0/3	Incompatibilidad ABO
8 m	Antecedente familiar	11	1,35	99,9	0/3	Normal
50 d	Antecedente familiar	7	2,00	80,5	0/3	Normal
8 d	Anemia hemolítica neonatal	34	10,26	45,0	2/3	Esferocitosis hereditaria
42 d	Anemia hemolítica neonatal + Antecedente familiar	23	3,28	22,7	3/3	Esferocitosis hereditaria
1 m	Anemia hemolítica neonatal + Antecedente familiar	38	4,17	17,6	3/3	Esferocitosis hereditaria
3 a	Antecedente familiar	7	1,38	100,0	0/3	Normal
21 d	Anemia hemolítica neonatal + Antecedente familiar	36	5,88	71,2	2/3	Esferocitosis hereditaria
23 m	Antecedente familiar	13	1,12	81,9	0/3	Normal

5'EMA-CF, citometría de flujo con eosina-5'-maleimida; CH, criohemólisis hipertónica; FOE-CF, fragilidad osmótica eritrocitaria por citometría de flujo; NR, no realizada; ESH, esferocitosis hereditaria
Los resultados positivos se indican en letra cursiva

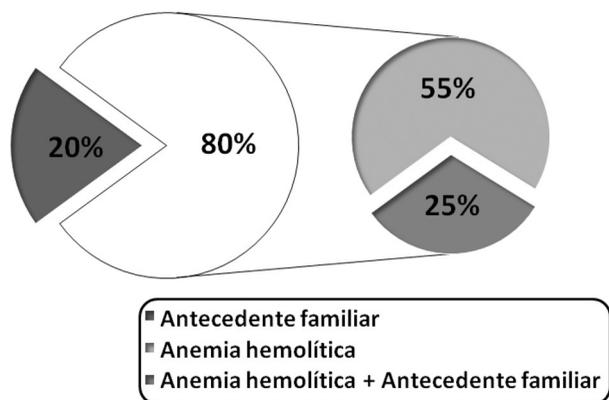


Fig. 1.- Distribución de los motivos de estudio.

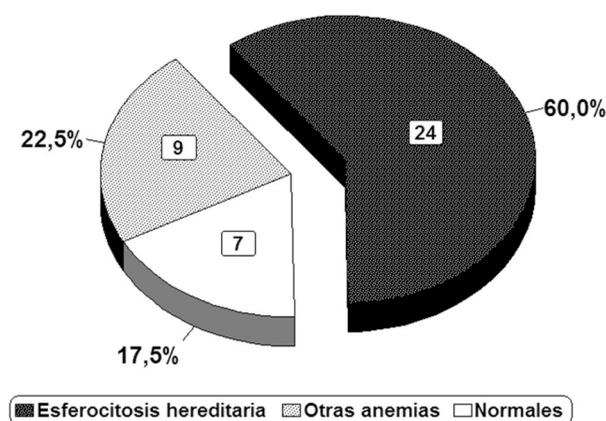


Fig. 2.- Distribución de los diagnósticos definitivos.

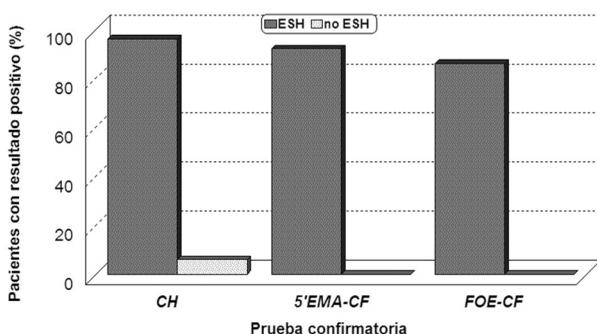


Fig. 3.- Porcentaje de resultados positivos para cada prueba en pacientes con y sin esferocitosis hereditaria. CH, criohemólisis; 5'EMA-CF, citometría de flujo con eosina-5'-maleimida; FOE-CF, fragilidad osmótica eritrocitaria por citometría de flujo.

único resultado falso positivo se observó en la CH de un neonato con enfermedad hemolítica del recién nacido secundaria a incompatibilidad ABO. La mayoría de los pacientes con ESH tuvo resultados positivos

para todas las pruebas realizadas. Solo 6 de ellos presentaron resultado normal en una de las pruebas: 2 para 5'EMA-CF, 1 para CH y 3 para FOE-CF.

DISCUSIÓN

La ictericia neonatal es a menudo la primera manifestación de ESH, asociándose a anemia en el 50-80% de los casos^{5,14,15}. Aproximadamente el 50% de los pacientes con ESH presentan antecedente de ictericia neonatal^{1,14-17}. Saada y col observaron que el 1% de los neonatos ictericos con requerimiento de luminoterapia padecían ESH¹⁸, la que es actualmente reconocida como una causa importante de kernicterus^{19,20}. Por lo tanto, al evaluar un neonato con anemia hemolítica la ESH es uno de los principales diagnósticos diferenciales a tener en consideración. A pesar de ello, Christensen y Henry han postulado recientemente que la ESH es una causa significativamente subdiagnosticada de hiperbilirrubinemia neonatal²¹.

Actualmente se dispone de varias pruebas confirmatorias para el diagnóstico de ESH. Sin embargo, ninguna de ellas puede detectar al 100% de los pacientes^{1,5,6,8,10,11,22,23}. La curva de fragilidad osmótica eritrocitaria, que es positiva en aproximadamente 80% de los pacientes^{1,24,25}, es aún considerada como el "patrón oro" por algunos autores^{5,22,26}, aunque no es útil para diferenciar entre ESH y esferocitosis secundaria a otras patologías (anemia hemolítica autoinmune, incompatibilidad ABO, eliptocitosis hereditaria esferocítica)^{7,26,27}. El estudio de proteínas de membrana (SDS-PAGE) es un procedimiento engorroso que permite demostrar cual es la proteína deficiente en poco más del 70% de los pacientes^{1,4,26,28-30}. Su presunta utilidad como marcador de severidad según cual sea la deficiencia encontrada es actualmente motivo de controversia^{1,10,31-33}. Por lo tanto, la mayoría de los autores consideran que no debe utilizarse como prueba de rutina para el diagnóstico de ESH^{1,5,7,10}. La CH mide el grado de hemolisis de los eritrocitos suspendidos en un medio hipertónico cuando son expuestos a un cambio brusco de temperatura³⁴. Como la prueba no depende de la relación superficie/volumen sino de la integridad de las proteínas de membrana, da resultado normal en la esferocitosis secundaria a anemia hemolítica autoinmune³⁵. Sin embargo, hay opiniones controvertidas respecto a su utilización como prueba de rutina^{5,7,10,22,36-38}, debido a los resultados discordantes informados por varios autores. Mientras que Streichman y Gescheidt comunicaron una especificidad de 90% y sensibilidad de 100%³⁶, Mariani y col encontraron una sensibili-

dad marcadamente inferior (53%)¹⁰. En un estudio anterior¹, la especificidad y sensibilidad observada en nuestro grupo de pacientes fue similar a la comunicada por Streichman y Gescheidt. La 5'EMA-CF mide la intensidad de fluorescencia de glóbulos rojos marcados con eosina-5' maleimida, la que se une predominantemente a la banda 3 de la membrana eritrocitaria²⁷. El método ha demostrado alta especificidad (96%-99%) y sensibilidad (89%-97%) para el diagnóstico de ESH en varios estudios^{1, 27, 39-43}, confirmando su utilidad. La FOE-CF se basa en cuantificar la hemólisis que se produce cuando se adiciona agua a una suspensión de eritrocitos en solución fisiológica. El número de eritrocitos suspendidos se evalúa por citometría de flujo en tiempo real antes y después del agregado de agua. Won y Suh describieron la prueba, encontrando que fue positiva en los 11 pacientes con ESH estudiados¹³, y recientemente Warang y col comunicaron que la prueba tenía sensibilidad de 100% y especificidad de 98% para el diagnóstico de ESH⁴³.

Como consecuencia de las limitaciones que presenta cada prueba, el procedimiento habitual es realizar varias de ellas simultáneamente para poder confirmar el diagnóstico. En nuestro laboratorio, los estudios de rutina incluyen curvas de fragilidad osmótica eritrocitaria inmediata e incubada, prueba de autohemólisis con y sin agregado de glucosa, CH, 5'EMA-CF y FOE-CF. Sin embargo, para realizar todas estas pruebas se requiere una muestra de 8-10 ml de sangre. Bolton-Maggs y col recomiendan el uso de CH y 5'EMA-CF como las pruebas más útiles y más sencillas de realizar^{7, 44}. Coincidentemente, en un estudio anterior observamos que la asociación de CH y 5'EMA-CF mostró la mayor exactitud para el diagnóstico de ESH, con una sensibilidad de 93,5%¹. Por tal motivo, decidimos evaluar la precisión de ambas pruebas al ser realizadas con sangre capilar. Observamos que no había diferencias en los resultados obtenidos con sangre capilar o venosa ni para la prueba de 5'EMA-CF⁴⁵ ni para la CH (datos no publicados). En un informe preliminar, comunicamos que también la FOE-CF puede ser realizada utilizando sangre capilar⁴⁶.

Nuestros resultados muestran que el uso simultáneo de estas tres pruebas permite confirmar el diagnóstico de ESH en el 100% de los casos. La sensibilidad fue de 96% para CH, 92% para 5'EMA-CF y 86% para FOE-CF. Estos resultados son similares a los comunicados con el uso habitual de sangre venosa^{1, 13, 43}. El único resultado falso positivo se vió en un neonato con incompatibilidad ABO, ob-

servación que merece una futura investigación. La facilidad de toma de la muestra y el hecho de poder disponer rápidamente (dentro de las 24 horas de realizada la extracción) de los resultados confirmatorios del diagnóstico permiten un manejo más adecuado en los pacientes más pequeños. De hecho, hemos podido realizar diagnóstico de certeza de ESH en un niño de 2 y en otro de 8 días de vida. No se han publicado hasta la fecha otros estudios relativos al uso de sangre capilar para realizar estas pruebas.

En conclusión, la utilización de sangre capilar demostró ser útil para el diagnóstico de ESH. El uso de muy pequeños volúmenes de sangre permite realizar un diagnóstico etiológico más precoz en recién nacidos y lactantes pequeños. Estos resultados necesitan ser confirmados en poblaciones más grandes, que incluyan tanto pacientes con ESH como con anemias hemolíticas de otras etiologías.

BIBLIOGRAFÍA

1. Crisp RL, Solari L, Vota D, y col. 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: 625-634.
2. 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: 295-299.
3. Ricard MP, Gilsanz F, Millan I. Erythroid membrane protein defects in hereditary spherocytosis. A study of 62 Spanish cases. **Haematologica** 2000; 85: 994-995.
4. 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: 357-359.
5. Grace RF, Lux SE. Disorders of the red cell membrane. *Hematology of Infancy and Childhood*. SH Orkin, DG Nathan, D Ginsburg, DE Fisher, SE Lux 2009, p 659-838. Saunders, Philadelphia.
6. Hassoun H, Palek J. Hereditary spherocytosis: a review of the clinical and molecular aspects of the disease. **Blood Rev** 1996; 10: 129-147.
7. Bolton-Maggs PHB, Stevens RF, Dodd NJ, Lamont G, Tittensor P, King MJ 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: 455-474.
8. Gallagher PG. Red cell membrane disorders. *Hematology*. American Society of Hematology, Educational Program 2005.

9. Gallagher PG, Forget BG. Hereditary spherocytosis, elliptocytosis and related disorders. Williams Hematology. E Beutler, MA Lichtman, BS Coller, TJ Kipps, U Seligsohn 2001, p 503-518. McGraw-Hill, New York.
10. Mariani M, Barcellini W, Vercellati C, y col. Clinical and hematologic features of 300 patients affected by hereditary spherocytosis grouped according to the type of the membrane protein defect. **Haematologica** 2008; 93: 1310-1317.
11. Bianchi P, Fermo E, Vercellati C, y col. Diagnostic power of laboratory tests for hereditary spherocytosis: a comparison study in 150 patients grouped according to molecular and clinical characteristics. **Haematologica** 2012; 97: 516-523.
12. 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: 1299-1301.
13. Won DI, Suh JS. Flow cytometric detection of erythrocyte osmotic fragility. **Cytometry Part B** 2009; 76B: 135-141.
14. Burman D. Congenital spherocytosis in infancy. **Arch Dis Child** 1958; 33: 335-351.
15. Schroter W, Kashnitz E. Diagnosis of hereditary spherocytosis in newborn infants. **J Pediatr** 1983; 103: 460-466.
16. Stamey CC, Diamond LK. Congenital hemolytic anemia in the newborn. **Am J Dis Child** 1957; 94: 616-624.
17. Pinto L, Iolascon A, Miraglia del Giudice E, y col. The Italian pediatric survey on hereditary spherocytosis. **Int J Pediatr Hematol Oncol** 1995; 2: 43-47.
18. Saada V, Cynober T, Brossard Y, y col. Incidence of hereditary spherocytosis in a population of jaundiced neonates. **Pediatr Hematol Oncol** 2006; 23: 387-397.
19. Berardi A, Lugli L, Ferrari F, y col. Kernicterus associated with hereditary spherocytosis and UGT1A1 promoter polymorphism. **Biol Neonat** 2006; 90: 243-246.
20. Sgro M, Campbell D, Shah V. Incidence and causes of severe neonatal hyperbilirubinemia in Canada. **CMAJ** 2006; 175: 587-590.
21. Christensen RD, Henry E. Hereditary spherocytosis in neonates with hyperbilirubinemia. **Pediatrics** 2010; 125: 120-125.
22. Iolascon A, Avvisati RA. Genotype/phenotype correlation in hereditary spherocytosis. **Haematologica** 2008; 93: 1283-1288.
23. King MJ, Telfer P, MacKinnon H, y col. Using the eosin-5-maleimide binding test in the differential diagnosis of hereditary spherocytosis and hereditary pyropoikilocytosis. **Cytometry Part B** 2008; 74B: 244-250.
24. Korones D, Pearson HA. Normal erythrocyte osmotic fragility in hereditary spherocytosis. **J Pediatr** 1989; 114: 264-266.
25. Dacie JV, Lewis SM, Luzzato L. Investigation of the hereditary haemolytic anaemias: membrane and enzyme abnormalities. **Practical Haematology**. JV Dacie, SM Lewis 1991, p 195-225. Churchill Livingstone, Edinburgh.
26. Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N. Hereditary spherocytosis. **Lancet** 2008; 372: 1411-1426.
27. 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: 924-933.
28. Miraglia del Giudice F, Iolascon A, Pinto L, Nobili B, Perrotta S. Erythrocyte membrane protein alterations underlying clinical heterogeneity in hereditary spherocytosis. **Br J Haematol** 1994; 88: 52-55.
29. 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: 118-135.
30. Lee YK, Cho HI, Park SS, y col. Abnormalities of erythrocyte membrane proteins in Korean patients with hereditary spherocytosis. **J Korean Med Sci** 2000; 15: 284-288.
31. 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: 1579-1583.
32. Jarolim P, Murray JL, Rubin HL, y col. Characterization of 13 novel band 3 gene defects in hereditary spherocytosis with band 3 deficiency. **Blood** 1996; 88: 4366-4374.
33. 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.
34. Streichman S, Gescheidt Y, Tatarsky I. Hypertonic cryohemolysis: a diagnostic test for hereditary spherocytosis. **Am J Hematol** 1990; 35: 104-109.
35. Streichman S, Kahana E, Tatarsky I. Hypertonic cryohemolysis of pathologic red blood cells. **Am J Hematol** 1985; 20: 373-381.
36. Streichman S, Gescheidt Y. Cryohemolysis for the detection of hereditary spherocytosis: correlation studies with osmotic fragility and autohemolysis. **Am J Hematol** 1998; 58: 206-212.
37. 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: 247-251.
38. Iglauer A, Reinhardt D, Schröter W, Pekrun A. Cryohemolysis test as a diagnostic tool for hereditary spherocytosis. **Ann Hematol** 1999; 78: 555-557.
39. Stoya G, Gruhn B, Vogelsang H, Baumann E, Linss W. Flow cytometry as a diagnostic tool for hereditary spherocytosis. **Acta Haematol** 2006; 116: 186-191.
40. 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: 570-574.
41. Girodon F, Garçon L, Bergoin E, y col. 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; 468-470.
42. Kar R, Rao S, Srinivas UM, Mishra P, Pati HP. Clinico-hematological profile of hereditary spherocytosis: experience from a tertiary care center in North India. **Hematology** 2009; 14: 164-167.

43. Warang P, Gupta M, Kedar P, y col. Flow cytometric osmotic fragility - An effective screening approach for red cell membranopathies. **Cytometry Part B** 2011; 80B: 186-190.
44. Bolton-Maggs PH, Langer JC, Iolascon A, Tittensor P, King MJ; General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis-2011 update. **Br J Haematol** 2012; 156: 37-49.
45. Crisp R, Solari L, Gammella D, y col. Use of capillary blood to perform the eosin-5'-maleimide flow cytometry (EMA-FC) test: Results are comparable to venous blood. **Haematologica** 2010; 95(suppl.2): 700, abs. 1808.
46. Crisp R, Solari L, Gammella D, y col. Flow cytometric osmotic fragility (FC-OF) can replace the traditional osmotic fragility (OF) test? Preliminary results. **Haematologica** 2010; 95 (suppl. 2): 703, abs. 1816.