

©Borgis

*Anna Adamowicz-Salach

Sferocytoza wrodzona u dzieci – badania diagnostyczne i postępowanie terapeutyczne

Hereditary spherocytosis in children – diagnosis and treatment

Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny
Kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Michał Matysiak

Streszczenie

Wrodzone niedokrwistości hemolityczne stanowią grupę kilkudziesięciu chorób, które charakteryzuje skrócony czas przeżycia krwinek czerwonych. W obrazie klinicznym stwierdza się niedokrwistość o różnym stopniu nasilenia, żółtaczkę i powiększenie śledziony. Jedną z nich jest sferocytoza wrodzona. Z uwagi na to, że przebieg kliniczny sferocytozy wrodzonej bywa mało charakterystyczny, co jest szczególnie ważne w odniesieniu do pacjentów w okresie niemowlęcym, zdarzają się przypadki błędnego kwalifikowania do splenektomii. W pracy przedstawiono badania diagnostyczne, a także stosowanie u niemowląt erytropoetyny w celu uniknięcia konieczności transfuzji koncentratów krwinek czerwonych.

Słowo kluczowe: sferocytoza wrodzona, badania laboratoryjne, rozpoznanie, leczenie

Summary

Congenital hemolytic anemia are group of diseases characterized by shortening of the survival time of red blood cells. In clinical picture various degrees of anemia, jaundice and splenectomy are observed. One of them is hereditary spherocytosis. Given that clinical course of spherocytosis may often be not characteristic, which is especially evident for infants, there are still cases of qualification for splenectomy. This review presented the laboratory tests and erythropoietin therapy in order to avoid the need for transfusion.

Key words: hereditary spherocytosis, laboratory tests, diagnosis, treatment

WSTĘP

Sferocytoza wrodzona jest niedokrwistością hemolityczną, która często występuje w populacji północnoeuropejskiej, jej rozpowszechnienie określa się na 1:2000 (1, 2). Po raz pierwszy została opisana w 1871 roku przez belgijskich lekarzy Vanlair i Masiusa. Przedstawili oni chorobę z niedokrwistością, żółtaczką, powiększeniem śledziony i okresowymi bólami brzucha. Podobne objawy występowały u jej siostry i matki. Chorobę nazwali microcythemią. Następnie na początku XX wieku Chauffard stwierdził, że nieprawidłowe krwinki czerwone, które pojawiają się w tej chorobie, posiadają zmniejszoną oporność osmotyczną (1-3).

Kliniczny przebieg sferocytozy wrodzonej w okresie rozwojowym jest zmienny, dotyczy to szczególnie okresu niemowlęcego, w którym pojawia się niejed-

nokrotnie głęboka niedokrwistość i hiperbilirubinemia. W przypadku ponad 60% noworodków znaczna żółtaczka jest wynikiem sferocytozy wrodzonej. Stopień nasilenia objawów choroby jest różny, począwszy od bardzo niewielkich, w jej łagodnej postaci, przez umiarkowane, do ciężkich, z uzależnieniem od transfuzji koncentratów krwi (1, 2, 4, 5).

W 75% przypadków choroba występuje rodzinnie. U dorosłych, w obrębie jednej i tej samej rodziny, obserwuje się czasami różnorodne objawy kliniczne. Jest to związane z występowaniem dodatkowych zaburzeń genetycznych. Obecność genu *UGT1A1* nasila metabolizm bilirubiny i powoduje wystąpienie zespołu Gilberta. U chorych na sferocytozę powoduje dodatkowo wzrost stężenia bilirubiny i zwiększoną skłonność do kamicy pęcherzyka żółciowego (1-3, 5).

PATOFIZJOLOGIA

Sferocytoza wrodzona jest spowodowana anomaliami w budowie białek błony komórkowej i cytoszkieletu erytrocytów. Niedobór pojedynczego białka często wywołuje niedobór białka lub białek z nim powiązanych (1, 2, 5, 6). Błona krwinki czerwonej składa się z podwójnej błony lipidowej, białek integralnych i białek cytoszkieletu. Dotychczas poznano ponad 700 białek znajdujących się w krwinkach czerwonych, z czego około 130 to białka błonowe. W ich skład wchodzi kompleks białka prążka 3, kompleks tetramerów spektryny, kompleks białek wiążących oligomery spektryny oraz kompleks białek Rh. Główną rolę w utrzymaniu trwałości krwinek czerwonych pełni wielobiałkowy kompleks białek strukturalnych. Podstawowym składnikiem cytoszkieletu jest spektryna z podjednostkami α i β , ankiryna, białko prążka 4.2 i białko prążka 4.1 oraz aktyna. W skład białek integralnych wchodzi glikoforyny A, B i C z nośnikami błonowych receptorów i antygenów oraz transbłonowe białko prążka 3. Spektryna jest tetrametrycznym białkiem, które w swej środkowej części poprzez ankiryne łączy się z białkiem prążka 3. Natomiast w częściach dystalnych spektryna łączy się z glikoforyną C przy udziale białka prążka 4.1 i p55. Białka kompleksu Rh – polipeptydy Rh i glikoproteiny powiązane z Rh (RhAG), poprzez ankiryne również łączą się ze spektryną (1-5, 7).

Spektryny α i β są skrócone wzajemnie wzdłuż długich osi i tworzą dimery, które następnie na zasadzie interakcji głowa-głowa łączą się w tetramery. Utworzona w ten sposób siatka jest podstawą cytoszkieletu, którego najważniejszym zadaniem jest utrzymanie elastycznego i trwałego rusztowania błony komórkowej. Białko prążka 3 ma podwójną funkcję. Jego domena zewnątrzkomórkowa pełni rolę transportera anionów ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$), natomiast wewnętrzna, cytoplazmatyczna jest miejscem zakotwiczenia białka prążka 4.2, a poprzez ankiryne z występującym w formie tetramerów szkieletem zbudowanym ze spektryn α i β . W konsekwencji cytoszkielet zawieszony jest w błonie komórkowej erytrocyta.

Wśród białek błonowych rozróżnia się interakcje pionowe i poziome. W interakcji pionowej bierze udział białko prążka 3, RhAG, białko prążka 4.2, ankiryna i spektryna β . Interakcja pozioma zachodzi między łańcuchami spektryny α i β , między spektryną β i białkiem prążka 4.1 oraz między białkiem 4.1 i aktyną (2, 7). W wyniku mutacji genetycznych dochodzi do zmian ilościowych lub jakościowych białek cytoszkieletu. Zaburzenia interakcji pionowych wywołują sferocytozę wrodzoną.

Sferocytoza wrodzona jest chorobą heterogenną, spowodowaną przez różne mechanizmy dziedziczenia, co wiąże się z różnymi anomaliami białek błonowych. W sferocytozie zmniejsza się wytrzymałość, elastyczność i integralność błony krwinek czerwonych, dochodzi do odszczepienia cytoszkieletu od leżącej nad nim dwubłony lipidowej, lipidy błonowe ulegają uwolnieniu,

zmniejsza się pole powierzchni krwinek czerwonych, które przyjmują postać mikrosferocytów (2, 5-7).

Sferocytoza wrodzona w ponad 75% przypadków dziedziczona jest w sposób autosomalny dominujący. U pozostałych 25% chorych dziedziczenie jest autosomalnie recesywne lub mają miejsce mutacje spontaniczne *de novo* (1-3, 5, 8, 9). Najczęściej są opisywane mutacje genu ankiryny (ANK1). Manifestują się one niedoborem ankiryny i spektryny. Już w erytoblastach, wskutek niedoboru ankiryny, powstaje zbyt mało wiązań dla spektryny, a część wytworzonej spektryny ulega degradacji. W przypadku spektryny mutacje najczęściej dotyczą genu kodującego łańcuchy β (SPTB). Mutacje w obrębie genów kodujących łańcuchy α spektryny (SPTA1) dziedziczone są autosomalnie recesywnie. Wywołują one rzadziej chorobę, ponieważ spektryna α wytwarzana jest w 3-4-krotnym nadmiarze. Mutacje genu białka prążka 3 (EPB3) dziedziczone są głównie w sposób dominujący i występują u około 20-30% chorych ze sferocytozą wrodzoną. Niedoboru białka prążka 3 towarzyszy często wtórnie niedobór białka prążka 4.2. Izolowany niedobór białka 4.2 występuje u 5% chorych na sferocytozę wrodzoną i dziedziczony jest w sposób autosomalny recesywny (2, 7).

Rozpoznanie sferocytozy wrodzonej dziedziczonej w sposób autosomalny dominujący zwykle nie jest trudne. Choroba ma charakter rodzinny. W badaniu fizykalnym stwierdza się występowanie zażółcenia powłok i powiększenie śledziona. U chorego występuje niedokrwistość o różnym nasileniu, wzrost MCHC (średnie stężenie hemoglobiny w erytrocytach), wzrost RDW (wskaźnik zmienności objętości erytrocytów). W rozmazie krwi obwodowej znaleźć można mikrosferocyty. Liczba retikulocytów zwiększa się. Stężenie bilirubiny we krwi jest podwyższone (1-4, 10).

Trudności diagnostyczne mogą pojawiać się w przypadku umiarkowanych lub łagodnych postaci choroby, w sferocytozie dziedziczonej recesywnie, jak również w postaciach atypowych. U pacjentów z łagodną i umiarkowaną postacią sferocytozy wrodzonej stwierdza się zwykle prawidłowe stężenie hemoglobiny i bilirubiny. W rozmazie krwi obwodowej nie zawsze obecne są mikrosferocyty, obraz morfologiczny krwinek czerwonych i liczba retikulocytów mogą być prawidłowe. Szczególne trudności diagnostyczne występują u noworodków i niemowląt, zwłaszcza w pierwszym kwartale życia (1, 2, 11). Noworodki mają skrócony czas przeżycia krwinek czerwonych (u noworodków donoszonych – do 90 dni, u wcześniaków – do 50 dni) oraz zwiększoną oporność krwinek czerwonych na hipotoniczne roztwory NaCl. W tym okresie występuje u nich fizjologiczna makrocytoza erytrocytów i retikulocytoza. Dodatkowo nasilone objawy hemolizy związane są ze zwiększoną obecnością hemoglobiny płodowej, która słabo łączy się z 2,3-dwufosfoglicerynianem (2,3-DPG). Wzrost stężenia wolnego 2,3-DPG prowadzi do uszkodzenia błony erytrocytów. Równocześnie w pierwszych miesiącach życia występuje fizjolo-

giczne osłabienie erytropoezy, co prowadzi do braku kompensacyjnego wzrostu liczby krwinek czerwonych (1, 2, 11). Dlatego u niemowląt niedokrwistość spowodowana przez sferocytozę jest bardziej nasiloną niż w późniejszym okresie. Często konieczne jest stosowanie uzupełniającej transfuzji krwi.

BADANIA DIAGNOSTYCZNE W ZABURZENIACH BUDOWY BŁONY ERYTROCYTÓW

Głównym badaniem przesiewowym stosowanym w rozpoznawaniu sferocytozy wrodzonej jest badanie oporności osmotycznej erytrocytów. W tym celu wykorzystywane są dwie metody. Pierwsza opracowana przez Daciego, opiera się na ocenie oporności osmotycznej krwinek czerwonych w hipotonicznym roztworze NaCl (norma: początek hemolizy 0,45%, koniec 0,3%). W przebiegu ciężkiej sferocytozy oporność osmotyczna jest znacznie zmniejszona. Początek i koniec hemolizy występuje w wyższych niż normalnie stężeniach NaCl. Hemoliza zaczyna się przy stężeniu wynoszącym 0,85-0,5 g/dl. W łagodnej sferocytozie wynik jest zwykle prawidłowy. Badanie to jest niemiarodajne u noworodków i młodych niemowląt z powodu fizjologicznie zwiększonej oporności osmotycznej w tym okresie życia. Druga metoda jest szybsza. W zakwaszonym glicerolu (AGLT) oznacza się hemolizę krwinek czerwonych. Określa się czas, który jest potrzebny do lizy 50% krwinek czerwonych. Prawidłowo wynosi on ponad 1800 sekund, natomiast jest znacznie skrócony w ciężkiej i umiarkowanej postaci sferocytozy: do 25-150 sekund (1-3, 12).

Nową metodą, która zwiększyła możliwości diagnostyczne, jest wprowadzona przez King w 2000 roku cytometryczna analiza białek błon erytrocytów – test EMA (*EMA binding test*) (1, 2, 7, 13, 14). Badanie pozwala na rozpoznanie sferocytozy wrodzonej, pyropoikilocytozy, owalocytozy oraz niedokrwistości dyserytropoetycznej typu II. Test jest czuły (92,7%) i specyficzny (99,1%), pozwala na wykrywanie defektów w błonie erytrocytów nawet po przetoczeniu krwi. Fluorescencja krwinek czerwonych w 80% spowodowana jest przez wiązanie barwnika fluorescencyjnego eozyno-5' maleimidu z lizyną (Lys-430), która znajduje się w zewnątrzkomórkowej części białka prążka 3, i w znacznie mniejszym stopniu z białkami związanymi z kompleksem Rh. Zmniejszenie wiązania EMA o 25-30% w stosunku do kontroli występuje w sferocytozie wrodzonej i świadczy o niedoborze jednego z białek błony i cytoszkieletu krwinek czerwonych. Kolejną metodą diagnostyczną jest test kriohe-molizy oparty na metodzie opisanej przez Steichmana i wsp. (15). Jego swoistość jest oceniana na około 95%. Krwinki czerwone są poddane działaniu roztworu soli i niskiej temperatury. Za normę przyjmuje się wynik hemolizy w zakresie od 3 do 15%. Kriohe-moliza > 20% występuje w sferocytozie wrodzonej (1, 12-16).

W przypadku sferocytozy wrodzonej o nietypowym obrazie klinicznym lub przy braku obciążającego wywiadu rodzinnego wykonuje się analizę białek cytoszkieletu w SDS-PAGE, w elektroforezie w żelu

poliakrylamidowym. Na elektroforetogramie widoczne są zmniejszone ilości białka, w stosunku do którego wystąpiła mutacja oraz białek od niego zależnych (17). Natomiast w niejasnych lub budzących wątpliwości przypadkach wskazane jest wykonanie u dzieci badań genetycznych z zastosowaniem sekwencjonowania DNA i metody Real-Time PCR (1, 2, 8).

POSTĘPOWANIE LECZNICZE W SFEROCYTOZIE WRODZONEJ

Kliniczne objawy sferocytozy wrodzonej ujawniają się od pierwszych tygodni życia dziecka w postaci nasilonej niedokrwistości i żółtaczki. Z tego powodu niejednokrotnie konieczne jest zastosowanie uzupełniającej transfuzji koncentratu krwinek czerwonych (1, 2). U niemowląt alternatywną metodą postępowania jest stosowanie podskórnych wstrzyknięć z erytropoetyny (rHu-Epo) (18). U starszych dzieci rodzaj stosowanego leczenia jest ściśle związany z przebiegiem choroby, która może mieć postać łagodną, umiarkowaną lub ciężką. Stosowanie transfuzji koncentratu krwinek czerwonych jest zwykle ograniczone do chorych z ciężką postacią choroby, u których w przebiegu przełomu hemolitycznego lub aplastycznego wystąpiła ciężka niedokrwistość lub objawy braku adaptacji do obniżonego stężenia hemoglobiny i zmniejszonej liczby krwinek czerwonych. W ciężkiej postaci sferocytozy wrodzonej, obciążonej częstymi transfuzjami, leczeniem z wyboru jest splenektomia. Współistnienie sferocytozy z kamicą pęcherzyka żółciowego i chorobą Gilberta jest wskazaniem do rozważenia decyzji o operacji usunięcia śledziony, niezależnie od klinicznej postaci choroby (1, 2, 19). W zależności od wieku dziecka śledzionę usuwa się w całości lub przeprowadza się częściowe jej usunięcie (19-21). U dzieci z umiarkowaną i ciężką postacią sferocytozy wrodzonej stosuje się przewlekłą suplementację kwasu foliowego (1).

DOŚWIADCZENIA WŁASNE

Rozpoznanie sferocytozy wrodzonej nie jest trudne w przypadku, gdy dziecko ma obciążający wywiad rodzinny i typowe objawy kliniczne. Trudności diagnostyczne pojawiają się wówczas, gdy objawy niedokrwistości hemolitycznej ujawnią się w pierwszych miesiącach życia lub w przypadku wystąpienia atypowej lub łagodnej postaci choroby. Z tego powodu rozpoznanie sferocytozy zdarza się także w wieku dojrzłym.

Przebadano 150 dzieci z podejrzeniem sferocytozy wrodzonej, 24 z nich było w wieku niemowlęcym (22). U wszystkich dzieci obserwowana była nasilona niedokrwistość i żółtaczka. Sferocytozę wrodzoną rozpoznano u 79 dzieci (52,7%), przy jej ustalaniu brano pod uwagę informacje uzyskane z wywiadu rodzinnego, kliniczny obraz choroby i wyniki przesiewowego testu EMA. W grupie dzieci, u których rozpoznana została sferocytoza wrodzona, średnia fluorescencja krwinek czerwonych z barwnikiem EMA była obniżona do 70,47% (SD = 6,68, mediana = 70,4). Liczba

krwinek czerwonych wynosiła średnio $3,63 \times 10^6/L$ (SD = 0,59, mediana = 3,6) i mieściła się w granicach od $2,6 \times 10^6/L$ do $4,9 \times 10^6/L$. Zawartość hemoglobiny wynosiła średnio 10,52 g/dL (SD = 1,86, mediana = 10,4). Średnie stężenie hemoglobiny w krwince czerwonej (MCHC) było zwiększone, średnia wartość wynosiła 35,82 g/dL (SD = 1,23, mediana = 35,6). Liczba retikulocytów była również zwiększona, średnia wynosiła 8,99% (SD = 5,55, mediana = 8,2), ARC odpowiednio $320,35 \times 10^9/L$ (SD = 196,79, mediana = 292,6). Wskaźnik anizocytozy RDW był podwyższony – średnia 19,27% (SD = 4,61, mediana = 18,5). Stężenie bilirubiny było zwiększone, średnia wynosiła 2,64 mg/dL/45,24 $\mu\text{mol/l}$ (SD = 2,44, mediana = 2,0/SD = 41,60, mediana = 34,0).

U 15 z 24 niemowląt (62,6%) wynik przesiewowego testu EMA pozwalał na rozpoznanie sferocytozy wrodzonej. W chwili postawienia rozpoznania wiek dzieci wynosił średnio 7,47 tyg. (SD = 3,91, mediana = 6,0). Obniżenie wiązania EMA wynosiło średnio 76,84% (SD = 5,15, mediana = 76,8).

Test EMA, jak wynika z piśmiennictwa, wykazuje wobec sferocytozy wrodzonej wysoką czułość (92,7%) i specyficzność (99,1%). Badanie pozwala na rozpoznanie sferocytozy o nietypowym przebiegu (7, 13, 14). Zaletą testu jest wykorzystanie do badania minimalnej ilości pełnej krwi (200 μl) pobranej na EDTA. Ma to szczególne znaczenie w przypadku niemowląt. Badanie trwa krótko, około 2 godzin. Ważną zaletą testu EMA jest to, że nie musi być on wykonany natychmiast po pobraniu krwi. Przechowywanie próbki do badania nawet do 7 dni nie wpływa znacząco na końcowy wynik (23, 24).

Pewne trudności w interpretacji testu EMA mogą wystąpić wtedy, gdy badanie wykonywane jest u niemowląt przedwcześnie urodzonych, u których występuje większa liczba dużych krwinek płodowych. Na błędny odczyt ma także wpływ pobranie krwi w czasie trwania infekcji. W obu przypadkach obserwuje się wzrost wiązania EMA w stosunku do kontroli.

Moje kilkuletnie doświadczenie ze stosowaniem testu EMA upoważnia mnie do stwierdzenia, że poprawia on w znacznym stopniu możliwości diagnostyczne w przypadku podejrzenia wrodzonej niedokrwistości hemolitycznej związanej z zaburzeniami w budowie błony i cytoszkieletu krwinek czerwonych. Możliwość wykonania badania z niewielkiej ilości krwi pacjenta ma szczególne znaczenie w odniesieniu do dzieci, szczególnie tych najmłodszych. Test EMA można traktować jako pierwszoliniowe badanie przesiewowe w diagnozowaniu wrodzonych niedokrwistości hemolitycznych. Badanie to może zastąpić mniej czułe i wymagające natychmiastowego wykonania badanie oporności osmotycznej erytrocytów (22).

Fizjologiczne osłabienie erytropoezy w pierwszych miesiącach życia wpływa na nasilenie niedokrwistości u niemowląt obciążonych sferocytozą wrodzoną. Jak podają Delhommeau i wsp., u około 80% dzieci ze sferocytozą wrodzoną konieczne jest wykonanie trans-

fuzji krwi w pierwszym roku życia (11). W 2000 roku Tchernia i wsp. przedstawili wielośrodkowe badanie, w którym zaprezentowane zostały efekty zastosowania erytropoetyny (rHu-Epo) u 16 niemowląt z głęboką niedokrwistością w przebiegu sferocytozy wrodzonej. Dobre wyniki terapeutyczne uzyskano u 81% dzieci. Niemowlęta otrzymywały rHu-Epo w dawce 1000 IU/kg/tydzień, leczenie trwało średnio 139 dni. W trakcie jego stosowania niemowlęta nie wymagały transfuzji krwi (18).

W materiale własnym erytropoetynę zastosowałam u 15 niemowląt chorujących na sferocytozę wrodzoną (22, 25). Rozpoznanie choroby postawione było na podstawie obciążającego wywiadu rodzinnego, obrazu klinicznego choroby oraz wyników testu EMA. W chwili rozpoczęcia leczenia średni wiek dzieci wynosił 7,42 tygodnia. Erytropoetynę zastosowałam w niższej dawce niż ta, którą przedstawiano w dotychczasowych doniesieniach. Niemowlęta otrzymywały 500 IU rHu-Epo na kg masy ciała na tydzień. Podawano ją w trzech iniekcjach podskórnych, dodatkowo uzupełniając leczenie doustnymi preparatami żelaza i witaminami (witamina B₆, kwas foliowy). U wszystkich dzieci uzyskano poprawę wskaźników czerwonych. Średnia ilość dawek erytropoetyny wynosiła 22,4 (SD = 14,76, mediana = 20). Odpowiadało to około 50 dniom leczenia. W tym czasie żadne z leczonych niemowląt nie wymagało transfuzji koncentratu krwinek czerwonych.

Dotychczasowe spostrzeżenia własne i innych autorów upoważniają mnie do stwierdzenia, że po zastosowaniu erytropoetyny następuje poprawa wskaźników krwinek czerwonych i z tego powodu może być ona stosowana w leczeniu ciężkiej niedokrwistości u niemowląt obciążonych sferocytozą wrodzoną.

PODSUMOWANIE

Reasumując, rozpoznanie sferocytozy wrodzonej dziedzicznej w sposób dominujący nie jest szczególnie trudnym zadaniem. W większości przypadków wystarczy informacja o rodzinnym występowaniu choroby i badania laboratoryjne potwierdzające hemolityczny charakter niedokrwistości. Więcej problemów z rozpoznaniem występuje w przypadku umiarkowanej postaci sferocytozy wrodzonej. Zwykle jest ona trudniejsza do rozpoznania, ponieważ u pacjentów często stwierdza się prawidłowe stężenie hemoglobiny i bilirubiny. W rozmazie krwi obwodowej może nie być mikrosferocytów, a liczba retikulocytów bywa tylko nieznacznie podwyższona. Podobne trudności stwarza atypowa lub łagodna postać choroby. Dodatkowe problemy diagnostyczne występują w grupie noworodków i niemowląt. We wszystkich tych przypadkach niezbędne jest wykonanie przesiewowego testu EMA. Postawienie prawidłowego rozpoznania jest szczególnie ważne w przypadku pacjenta, który ze względu na przebieg kliniczny choroby jest kwalifikowany do splenektomii.

PIŚMIENNICTWO

- Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis/the British Committee for Standards in Haematology – update 2011. *Br J Haematol* 2012; 156: 37-49.
- Gallager PG, Lux SE: Disorders of the erythrocyte membrane. [In:] Orkin SH, Nathan DG, Ginsburg D et al.: Nathan and Oski's Hematology of infancy and childhood. W.B. Saunders, wyd. 7, Philadelphia 2009: 560-684.
- Matysiak M, Adamowicz-Salach A: Wrodzone niedokrwistości hemolityczne. *Acta Haematol Pol* 2009; 40(2): 455-462.
- Adamowicz-Salach A, Romiszewska M, Siwicka A: Dziecko z żółtaczką w izbie przyjęć. *Ped po Dyplomie* 2012; 16(5): 76-80.
- An XU, Mohandas N: Disorders of red cell membrane. *Br J Haematol* 2008; 141: 367-375.
- Mohandas N, Gallagher G: Red blood cell membrane past, present and future. *Blood* 2008; 112: 3930-3948.
- King M-J: Diagnosis of red cell membrane disorders. *CME Bulletin Haematology* 2000; 3: 39-41.
- Maciąg M, Płochocka D, Mendek-Czajkowska E et al.: Molecular and haematological studies of four families with hereditary spherocytosis resulting from band 3 deficiency. *Acta Haematol* 2006; 622(116): 142-145.
- Maciąg M, Płochocka D, Adamowicz-Salach A, Burzyńska B: Novel beta-spectrin mutations in hereditary spherocytosis associated with decreased of mRNA. *Br J Haematol* 2009; 146: 326-332.
- Mullier F, Lainey E, Fenneteau O et al.: Additional erythrocytic and reticulocytic parameters helpful for diagnosis of hereditary spherocytosis: result of a multicentre study. *Ann Hematol* 2011; 90: 759-768.
- Delhommeau F, Cynober T, Schischmanoff PO et al.: Natural history of hereditary spherocytosis during the first year of life. *Blood* 2000; 95: 393-397.
- Crisp RL, Solari L, Vota D 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: 625-634.
- King M-J, Smythe JS, Mushens R: Eosin-5'-maleimide binding to band 3 and Rh-related proteins forms the basis of a screening test for hereditary spherocytosis. *Br J Haematol* 2004; 24: 106-113.
- Żarłak W, Adamowicz-Salach A, Ciepela O et al.: Ocena przydatności badań laboratoryjnych w diagnostyce sferocytosis wrodzonej. *Diagn Lab* 2012; 48: 25-31.
- Streichman S, Gescheidt Y: Cryohemolysis for the detection of hereditary spherocytosis: correlation studies with osmotic fragility and autohemolysis. *Am J Hematol* 1998; 58: 206-221.
- Iglauer A, Reinhardt D, Schröter W, Pekrun A: Cryohemolysis test as a diagnostic tool for hereditary spherocytosis. *Ann Hematol* 1999; 78: 555-557.
- Bianchi P, Fermo E, Vercellati C et al.: Diagnostic power of laboratory tests for hereditary spherocytosis: a comparison study in 150 patients grouped according to molecular and clinical characteristics. *Hematologica* 2012; 97(4): 516-523.
- Tchernia G, Delhommeau F, Perrota S et al.: Recombinant erythropoietin therapy as an alternative to blood transfusions in infants with hereditary spherocytosis. *Hematol J* 2000; 1: 146-152.
- Rawa K, Adamowicz-Salach A, Matysiak M et al.: Coexistence of Gilbert syndrome with hereditary haemolytic anaemias. *J Clin Pathol* 2012; 65(7): 663-665.
- Buesing KL, Kiernan C, Pastor AC et al.: Partial splenectomy for hereditary spherocytosis: a multi-institution review. *J Pediatr Surg* 2011; 46(1): 178-183.
- Review in guidelines for the prevention and treatment of infection in patients with an absent or dysfunctional spleen; prepared on behalf of the British Committee for Standards in Haematology by a Working Party of the Haemato-Oncology Task Force. *Br J Haematol* 2011; 155: 308-317.
- Adamowicz-Salach A: Kliniczne zastosowanie i ocena nowych metod diagnostycznych w rozpoznawaniu wybranych wrodzonych niedokrwistości hemolitycznych wieku dziecięcego. Rozprawa habilitacyjna, Warszawski Uniwersytet Medyczny 2009.
- Ciepela O, Kotuła I, Górka E et al.: Delay in the measurement of eosin-5'-maleimide(EMA) binding does affect the test result for diagnosis hereditary spherocytosis. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51(4): 817-823.
- Szmydki-Baran A, Adamowicz-Salach A, Gołębiowska-Staroszczyk S et al.: Ocena wpływu długości przechowywania próbki krwi na wynik testu EMA. *Doniesienie wstępne. Pediatr Pol* 2009; 84(5): 423-425.
- Adamowicz-Salach A, Zdebska E, Matysiak M et al.: Zastosowanie rekombinowanej erytropoetyny w leczeniu ciężkiej niedokrwistości u niemowląt z wrodzoną sferocytosis – doniesienie wstępne. *Pediatr Pol* 2006; 81(7): 483-487.

otrzymano/received:
zaakceptowano/accepted:

Adres/address:
*Anna Adamowicz-Salach
Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii WUM
ul. Marszałkowska 24, 00-576 Warszawa
tel.: +48 (22) 522-74-19, fax: 48 (22) 621-53-62
e-mail: anna.adamowicz@litewska.edu.pl