

## Onderzoek Hemoglobinopathieën in de praktijk

Het rapport van de werkgroep hemoglobinopathieën van de Vereniging Hematologische Laboratoriumdiagnostiek geeft het belang aan van het onderzoek naar hemoglobinopathieën. Teneinde behulpzaam te zijn bij de aanvragen naar dit onderzoek in de praktijk, heeft de VHL aan de werkgroep verzocht aanbevelingen te doen omtrent de gewenste wijze van aanvragen, van analyse en van interpretatie van de resultaten.

De werkgroep komt tot de volgende aanbevelingen:

### 1. Aanvragen

#### **Indicatiestelling door aanvrager**

De aanvrager dient bij het stellen van de indicatie voor hemoglobinopathie-onderzoek (HbP-onderzoek) rekening te houden met:

- a. Microcytair, hypochroom beeld met of zonder anemie
- b. Familie-anamnese
- c. Etnische afkomst

#### **Hemoglobinopathie-onderzoek op aanvraagformulier?**

Geadviseerd wordt om op het aanvraagformulier de aanvraag "HbP-onderzoek" (Hemoglobinopathie-onderzoek) te vermelden. Argumenten hiervoor:

- Volledig bloedbeeld is weinig selectief en specifiek als screening voor hemoglobinopathie (m.n. bij  $\alpha$ -thalassemie).
- Indicatiestelling door aanvrager, bv bij familie-onderzoek, bij screening bij allochtone zwangeren, etc., moet mogelijk zijn.

In bepaalde gevallen kan de etnische afkomst van de patiënt behulpzaam zijn bij de interpretatie van de onderzoeksresultaten. Daarom wordt aanbevolen op het aanvraagformulier ruimte te reserveren waarop de aanvrager de *ethnische afkomst* van de patiënt kan vermelden.

### 2. Laboratoriumonderzoek

#### **2.1. Bij aanvraag door arts**

De volgende onderzoeken worden aanbevolen, waarbij het mogelijk is dat een deel van de onderzoeken in een ander laboratorium wordt uitgevoerd. Voor een juiste interpretatie dient voldoende expertise binnen het laboratorium aanwezig te zijn.

##### **Protocol**

- a. Volledig bloedbeeld: Hb, RBC, MCV, MCH, reticulocyten.
- b. Onderzoek naar ijzerdeficiëntie (Ferritine of ZPP).
- c. HbP-analyse mbv HPLC of goede elektroforesetechniek gecombineerd met kwantitatieve HbA2 bepaling.
- d. Bij indicatie en/of aanwijzingen (zoals bij niet te behandelen (milde) anemie of bij familie-onderzoek),  $\alpha$ -thalassemie-onderzoek uitvoeren.
- e. In geval mogelijke HbS: bevestiging met sikkeltest of solubiliteitstest.

#### **2.2. Hb-analyse niet aangevraagd, maar aanwijzingen in laboratorium verkregen**

In de dagelijkse praktijk worden bij algemeen (hematologisch) onderzoek soms aanwijzingen verkregen voor een HbP bij een patiënt zonder dat specifiek onderzoek hiernaar is aangevraagd. Verdenking op een HbP kan bijvoorbeeld optreden bij onderzoek van:

##### **a. Volledig bloedbeeld:**

- Naar aanleiding van RBC-verdeling (RDW).
- Signalering na een berekening ingebouwd in celteller.
- Naar aanleiding van een handmatig gebruikte formule.

##### **b. Morfologisch-onderzoek van erythrocyten:**

- Het voorkomen van anisocytose, poikilocytose, schietschijfcelle en/of sikkelcellen

**c. Op basis van een andere analyse:**

- Bijvoorbeeld afwijking bij GlyHb (HbA1c) meting.

In deze gevallen kan – na overleg met de arts – het bovenbeschreven protocol (2.1) gevolgd worden.

### 3. Interpretatie van HbP-onderzoek

Aanbevolen wordt om HbP-onderzoek uit te voeren met (dedicated) HPLC-apparatuur en/of met een gevalideerde electroforesetechniek gecombineerd met een kwantitatieve HbA2-analyse.  $\alpha$ -thalassemie kan met deze technieken niet worden opgespoord.

**Meest voorkomende gevallen van  $\beta$ -thalassemie en abnormale Hb:**

- Normaal patroon met verhoogde HbA2 en soms licht verhoogde HbF: heterozygote  $\beta$ -thalassemie.
- Indien HbA aanwezig is naast een andere (sterke) Hb-fractie is er sprake van een heterozygote HbP (bv: heterozygote HbS, C, E, D of X).
- Aanwezigheid van HbS dient bevestigd te worden met een sikkeltest of solubiliteitstest.
- Bij bevestigde HbS dient het HbS-gehalte gekwantificeerd te worden.
- HbS tussen 35 en 50%: sikkelcel trait (SCT) door heterozygote HbA/S.
- HbS <35%: SCT, waarschijnlijk in combinatie met  $\alpha$ -thalassemie.
- HbS >50% gecombineerd met weinig of geen HbA: Sikkelcelziekte (SCZ) waarschijnlijk door homozygote HbS/S.
- HbS >50% gecombineerd met weinig of geen HbA en microcytose: mogelijk SCZ door combinatie HbS/ $\beta$ -thalassemie.
- HbS <50% in aanwezigheid van non-HbA fractie: mogelijk HbS/C, HbS/D, HbS/E of andere combinaties.

### 4. Opmerkingen en valkuilen

**Algemeen:**

- Let op ijzerstatus en eventuele infecties.
- Denk aan mogelijke transfusies.
- Hb en MCV hebben lage sensitiviteit. Bv, milde  $\alpha^+$ -thalassemie ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ) kan aanwezig zijn bij relatief hoge MCV (tot 90 fl).
- Bij kinderen jonger dan 1 jaar moeten de uitslagen met grote voorzichtigheid geïnterpreteerd worden. Bij  $\beta$ -thalassemie dragers jonger dan 1 jaar is de HbA2-analyse niet betrouwbaar. Indien mogelijk dient het onderzoek herhaald te worden wanneer het kind ouder is dan 1 jaar.
- Controleer de plausibiliteit van een afwijkend hemoglobinen met eventueel bekende ethnische gegevens, bijvoorbeeld:
  - HbC bij Negroiden
  - HbE en HbD bij Aziaten (maar HbD ook bij Europeanen)
  - HbS bij Afrikanen, Zuid-Europeanen, Zuid- en Midden-Amerikanen, Aziaten en mensen afkomstig uit het Caraïbisch gebied.
- HbS dient met een sikkeltest bevestigd te worden. Met de gebruikelijke analysetechnieken is niet met 100% zekerheid vast te stellen of er sprake is van HbC, E, D, etc. Houd dus rekening met mogelijke zeldzamere Hb-mutanten met retentietijd en/of loopafstand overeenkomend met HbS, C, E, D etc. Geadviseerd wordt om, ten behoeve van genetic counseling, met behulp van moleculaire analyse de exacte mutatie te bepalen. In de toelichtende tekst dient dit vermeld te worden.
- Bij gebruik van de sikkeltest moet men attent zijn op vals negatieve uitslagen bij:
  - Combinatie  $\alpha$ -thalassemie/HbS (remming sickling door lage HbS concentratie)
  - Bij pasgeborenen door aanwezigheid van hoog percentage HbF
  - Technisch: bij te sterk mengen op een vortex (menging met zuurstof) of door het onjuist afdichten met het dekglasje (luchtballen)(Opm.: in de eerste twee gevallen kan sickling alsnog bewerkstelligd worden indien de concentratie natrium metabisulfaat verdubbeld wordt)
- Gebruik informatieteksten bij thalassemieën, HbS, HbC, HbE en HbD (zie onder 5).

### ***β-Thalassemie***

- a. Grenswaarden HbA2 dienen in het eigen laboratorium met de gebruikte methode vastgesteld te worden (richtgetallen referentiewaarden: 2,5 – 3,5%).
- b. Het HbA2-gehalte van β-thalassemie patiënten is in de meeste gevallen verhoogd (tot ca 8%)<sup>1</sup>. Er zijn zeldzame β-thalassemie vormen met een normale of borderline HbA2-gehalte, meestal veroorzaakt door grote deleties<sup>1</sup>, door mutaties in het promotor gebied van het gen<sup>2</sup> of combinaties met δ-thalassemie<sup>3</sup>.
- c. Bij ijzerdeficiëntie kan het HbA2-gehalte fractioneel lager zijn. Echter, dit artefact kan een duidelijk verhoogde HbA2 niet in het normale gebied brengen<sup>4,5,6,7</sup>.
- d. Bij een gecombineerde α/β-thalassemie is het HbA2-gehalte doorgaans verhoogd<sup>8</sup> en is er vaak sprake van extreem lage MCV (< 60 fl) en MCH (< 1,2 fmol).
- e. Bij α-thalassemie is de HbA2 vaak fractioneel of duidelijk verlaagd<sup>9,10</sup>.
- f. In aanwezigheid van HbS kan het HbA2-gehalte vals verhoogd zijn. Wanneer 50% HbA aantoonbaar is en patiënt geen recente transfusie heeft gehad, is deze verhoogde HbA2 waarde geen aanwijzing van coëxisterende β-thalassemie<sup>11</sup>.

### ***α-Thalassemie***

- a. Met routine DNA-onderzoek (PCR) kunnen ca 80% van de deletiegevallen bij α-thalassemie worden opgespoord. Voor de overige gevallen is globinesynthese, Southern Blot, en DNA-sequentie-analyse vereist<sup>10</sup>.
- b. In het algemeen geldt de regel: hoe minder alfa ketens hoe lager het HbA2-gehalte. Bij --/αα of --/α (HbH-ziekte) kan de HbA2 concentratie duidelijk onder de ondergrens van normaal komen ook bij normale ferritine waarden. (<2.5%)<sup>9,10,12,13</sup>.

### ***Sikkelcel***

- a. Hb-mutanten die een negatieve lading verliezen (zoals HbS) migreren vaak als HbS. Bevestiging met sikkelceltest (natrium-metabisulfaat incubatie) en/of solubiliteitstest is daarom vereist.
- b. De commerciële test van Diamed wordt in de literatuur niet aanbevolen<sup>14</sup>.
- c. Bij HbS >50% denk aan differentiatie S/S, S/β-thalassemie, S/D, etc.
- d. Overweeg combinatie met α-thalassemie bij HbS <35%<sup>15</sup>.

## **5. Uitslagen en primaire preventie**

De uitslag is van grote waarde voor de primaire preventie van HbP major. Bij een positieve dragerschapuitslag voor HbS, HbC, HbE, HbD, β- of α-thalassemie wordt geadviseerd om de volgende toelichting aan de uitslag toe te voegen:

- a. Bij (jonge) kinderen: Dragerschapsonderzoek bij beiden ouders is, i.v.m. risico voor major vormen in een volgende zwangerschap, geïndiceerd.
- b. Bij jong volwassen: Dragerschapsonderzoek bij partner, broers en zusters is, i.v.m. risico voor major vormen in het nakomelingschap, geïndiceerd.
- c. Bij ouderen: Dragerschapsonderzoek bij (klein)kinderen is, i.v.m. risico voor major vormen in risicoparen uit de volgende generatie(s), geïndiceerd.

## **6. Laboratoria**

Onderzoek kan plaatsvinden in verschillende (ziekenhuis)laboratoria, afhankelijk van de aard van het onderzoek. Richtlijn:

- a. Voor basisanalyse in het dichtstbijzijnde laboratorium dat deze basisdiagnostiek uitvoert volgens het bovenbeschreven protocol.
- b. Voor beperkte moleculaire analyse (minimaal routine α-thalassemie-onderzoek) in een laboratorium in de regio die dat met voldoende ervaring uitvoert.
- c. Voor uitgebreide moleculaire analyse onderzoek laten uitvoeren door het Hemoglobinoopathieën Laboratorium in Leiden of het Sanquin Laboratorium (CLB) in Amsterdam.
- d. Complexe risicovaststelling en prenatale analyse wordt gedaan in het Hemoglobinoopathieën Laboratorium en DNA laboratorium van het Centrum voor Humane en Klinische Genetica te Leiden.

## 7. Literatuur

### **Algemeen**

Er is veel algemene literatuur in boeken, hoofdstukken en handboeken en via websites.

Aanbevolen:

- B.J. Bain: Haemoglobinopathy Diagnosis, Blackwell Science, 2001
- Website: [www.HbPinfo.com](http://www.HbPinfo.com) (en de daarin opgenomen links)

### **Referenties**

1. Thein, S.L.: Beta-thalassaemia. In: Baillieres Clin.Haematol. 11 (1998), 91-126
  2. Gonzales-Redondo, J.M., Stoming, T.A., Kutlar, A., et al. (1991). A C→T substitution at nt – 101 in a conserved DNA sequence of the promoter region of the  $\beta$ -globin gene is associated with silent beta thalassaemia. (1989) Blood 73; 1705-1711.
  3. Olds R.J., Sura, T., Jackson, B. et al. (1991). A novel  $\delta^o$  mutation in cis with Hb Knossos : a study of different genetic interactions in three Egyptian families. Br. Jour. Haematol. 78 :430-436.
  4. El-Agouza, I. Sirdah, M.: The effect of iron deficiency anemia on the levels of hemoglobinsubtypes: possible consequences for clinical diagnosis, Clin.Lab.Haematol. 24 (2002) 285-9
  5. Giordano P.C.: The effect of iron deficiency anemia on the levels of hemoglobinsubtypes: possible consequences for clinical diagnosis, Clin.Lab.Haematol. 25 (2003) (comment in press)
  6. Madan, N., Sikka, M., Sharma, S., Rusia, U.: Phenotypic expression of hemoglobin A2 in beta-thalassaemia trait with iron deficiency, Ann.Hematol. 77 (1998) 93-6
  7. Aghai, et al.: Discrimination between iron deficiency and heterozygous beta-thalassaemia in children, Am.J.Clin.Pathol. 85 (1986) 710-2
  8. Losekoot M, Beijer C, Giordano PC, van Gemenren ADJ, Oei YB and Bernini LF. Gekombineerde  $\alpha$ - en  $\beta$  -thalassaemie bij een Chinese familie in Nederland. Ned. Tijdschr. Geneesk. 133 (1989) 1218-23
  9. Wenning MRSC, Hartevelde CL, Giordano PC, Kimura EM, Saad STO, Costa FF and Sonati MF. Hemoglobin H disease resulting from the association of the  $-\alpha 3.7$  rightward deletion and the  $(\alpha\alpha)^{MM}$  deletion in a Brazilian patient. Eur J. Haematol 2002; 69: 179-181
  10. Giordano, P.C. In: Hemoglobinopathieën in Nederland 1998, 165-166 (ISBN 90-9011943-3)
  11. Giordano PC and Hartevelde CL. Chromatographic Measurement of Hb A2 in blood samples containing Sickle Hemoglobin. Letter to the editor. Annals of Clinical & Laboratory Science. 2000; 30: 430-1.
  12. Bernini, L.F., Hartevelde, C.L.: Alfa-thalassaemia. In Bailliere's Clin. Haematol. 11 (1998), 53-90.
  13. Huisman, T.H.J. et al. In: A syllabus of thalassaemia mutations. The Sickle Cell Anemia Foundation 1997 (Augusta, USA)
  14. Balasubramanian, J., Phelan, L., Bain, B.J.: Evaluation of a new screening test for sickle cell haemoglobin. Clin.Lab. Haematol. 23 (2001), 379-83
  15. Fodde, R. et al.: Prevalence and molecular heterogeneity of alfa+thalassaemia in two tribal populations from Andhra Pradesh, India. Hum. Genet. 80 (1988), 157-60
-