

Diagnostiek bij hemoglobinopathieën

Auteurs: Rob van Zwieten, Rode bloedcelchemie, Sanquin Diagnostiek

Familiaire anemie en sikkelcellen of intracellulaire precipitaten in een bloeditstrijkje kunnen wijzen op het voorkomen van afwijkend hemoglobine.

Een hypochroom microcytair bloedbeeld met schietschijfcellen ('target' cellen) en een verhoogde osmotische resistentie kunnen wijzen op thalassemie.

Onderzoek naar hemoglobinopathie gebeurt doorgaans door bepaling van soort en hoeveelheid van de aanwezige hemoglobinen met behulp van hoge-druk vloeistofchromatografie (HPLC). Zo nodig wordt dit uitgebreid met een iso-elektrische focussing (IEF) en een globine-analyse (door middel van 'reversed-phase' HPLC). In vrijwel alle gevallen is hiermee diagnose van klinisch relevante afwijkende hemoglobinevormen en β -thalassemie mogelijk.

Bèta-thalassemia minor gaat bijna altijd gepaard met een verhoogde concentratie van HbA₂. Bij ernstige vormen van α -thalassemieën is in vers afgenomen bloed HbH, een tetrameer van β -globine, zichtbaar. De meeste vormen van α -thalassemie zijn op eiwitniveau echter zeer lastig te diagnosticeren. Analyse op DNA-niveau heeft dan de voorkeur. Meestal wordt α -thalassemie veroorzaakt door deleties in het gebied van de α -globinegenen. Diagnostiek van α -thalassemie is gebaseerd op het aantonen van deze deleties. Vaak wordt dit gedaan door middel van gap-PCR, waarbij zeven van de meest voorkomende deleties kunnen worden aangetoond. Eventueel kunnen met behulp van een multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) ook andere, grote deleties in kaart worden gebracht. Omdat het type deletie vaak geassocieerd is met de etnische afkomst van de patiënt, is vermelding hiervan op het aanvraagformulier zinvol.

Bij duidelijke klinische of morfologische aanwijzingen van thalassemie, zonder afwijkingen in bovengenoemde testen, kan uitsluitel verkregen worden met behulp van een Hb-ketensynthese bepaling in reticulocyten. Bij alle hemoglobinopathieën kan nader onderzoek op DNA-niveau plaats vinden.

Als bij screening met de HPLC een afwijkend hemoglobine wordt gezien, dan dient dit altijd te worden bevestigd met een andere methode. Voor sikkelcelhemoglobine kan daarvoor de sikkelprecipitatie test worden gebruikt, bij andere afwijkende hemoglobines in eerste instantie IEF of indien van toepassing DNA-sequence onderzoek.

Valkuilen

- Bij onderzoek binnen 3 maanden na een bloedtransfusie wordt ook donorbloed in meer of mindere mate bepaald. Een transfusieverleden moet daarom worden gemeld op het inzendformulier.
- Bij kinderen jonger dan 1 jaar is de hemoglobine-synthese in ontwikkeling. Afwijkende Hb-vormen kunnen i.h.a. al worden gevonden direct na geboorte. In deze gevallen is het raadzaam het gevonden defect te bevestigen door DNA-onderzoek, bij familieleden of als het kind ouder is dan 1 jaar.
- Bij baby's is ook de synthese van HbA₂ nog in ontwikkeling. Het percentage HbA₂ wordt gebruikt voor diagnostiek van β -thalassemia minor en is daarmee pas betrouwbaar als kinderen ouder zijn dan 1 jaar. Diagnostiek op DNA-niveau is wel mogelijk bij deze zeer jonge kinderen.
- In zeldzame gevallen kan er sprake zijn van zeer instabiele Hb-vormen die enkele dagen na afname als eiwit niet meer aantoonbaar zijn. Bij aanwijzingen voor zo'n instabiel hemoglobine moet het bloed zo snel mogelijk na afname worden onderzocht en is het raadzaam om ook DNA-sequence onderzoek in te zetten.
- Regelmatig vinden komen combinaties voor van erythrocyten defecten in 1 patient. Het aantonen van een defect sluit een bijkomende oorzaak van anemie niet uit. B.v. ca 30 procent van de mensen met sikkelcel-hemoglobine heeft ook een α -thalassemie. Ook de combinatie van een Hb-pathie met glucose-6-fosfaatdehydrogenase deficientie komt regelmatig voor.

Familie- (vervolg)onderzoek naar erythrocytaire defecten

Erythrocytaire afwijkingen zijn (meestal) erfelijk bepaald. Soms is het zinvol om bij diagnose ook de familieleden te betrekken. Indien het onderzoek bij Sanquin wordt verricht is ten behoeve van dergelijk aanvullend onderzoek is op de website van Sanquin (www.sanquin.nl) een formulier beschikbaar waarmee familieonderzoek kan worden aangevraagd en toegelicht.

Benodigde materiaal en aanvullende informatie

In verschillende centra wordt bovengenoemd onderzoek uitgevoerd. Voor onderzoek naar hemoglobine afwijkingen is doorgaans drie ml EDTA bloed voldoende. Indien bekend, svp bij aanvraag vermelden of er in de afgelopen drie maanden bloedtransfusies zijn toegediend, de etnische achtergrond van de patiënt en of de anemie familiair is. Indien het ingezonden wordt naar Sanquin dan moet dit bij 4 °C worden verstuurd en bij voorkeur binnen 24h na afname op Sanquin worden behandeld. [Link naar aanvraagformulieren](#).

Diagnostiek van Sikkelcelziekte, β -Thalassemie, andere Hb-pathieën alsmede draagerschap voor deze afwijkingen:

- 1) Bepaling van het bloedbeeld met autoomaat (ADVIA) tbv Hb, Ht en MCV. Deze informatie is meestal niet beschikbaar op het Sanquin laboratorium en wordt niet gerapporteerd, maar intern gebruikt bij interpretatie van het hemoglobine-onderzoek
- 2) Hoge resolutie Hb-scheiding m.b.v. kationenwisselaar en HPLC ([link aanbrenen](#)).
Kwantificering van HbA₂, HbF t.b.v. diagnose beta-thalassemie, alsmede aantonen en kwantificering van eventuele afwijkende hemoglobines ([figuur 1](#))
- 3) Bevestigingsonderzoek (zo nodig)
 - a. Sikkelprecipitatietest ([link aanbrenen](#)) bij vermoeden aanwezigheid HbS
 - b. Iso elektische focussing (IEF) van hemoglobines bij afwijkend HPLC chromatogram ([figuur 2](#))
 - c. DNA sequence-onderzoek van de globine-genen (optioneel)
 - d. Scheiding van α en β -globine (losse Hb-ketens) (optioneel) ([figuur 3](#))

Sikkelcelprecipitatietest

Bij deze kwalitatieve testmethode wordt gebruik gemaakt van het feit dat zich een onoplosbaar kristal vormt na toevoeging aan HbS bevattend volbloed of onstold bloed van een sterk reducerend agens, zoals natrium hydrosulfiet, in aanwezigheid van een buffer. Vervolgens wordt macroscopisch bekeken of er troebeling in de testbuis aanwezig is of niet. De uitslag is daarom onderhevig aan interpretatie door de analist en kan positief (in het geval van aanwezigheid van HbS) of negatief uitvallen. Ook kan de test fout-negatief uitvallen, indien het HbS gehalte in het bloedmonster lager is dan de detectiegrens voor de test. Afhankelijk van de gebruikte kit is de test tot ongeveer 20% HbS betrouwbaar. Deze lage waarden zijn in het algemeen het geval bij kinderen onder de 3 tot 6 maanden. Om deze reden dient de test bij kinderen in deze leeftijdscategorie dan ook niet toegepast te worden.

Een andere manier om deze test uit te voeren, is om na toevoeging aan het volbloed van een 1% of 2% oplossing van natrium bisulfiet in buffer, een druppel van dit mengsel op een objectglas te brengen, dit af te dekken met een dekglas en vervolgens na 30 minuten onder de microscoop te bekijken of er sikkelcellen aanwezig zijn.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Met behulp van deze kwantitatieve testmethode worden de verschillende hemoglobine fracties gescheiden door middel van een kationenwisselaar, op grond van hun lading. Sommige varianten echter hebben dezelfde retentietijd en kunnen dus niet met HPLC onderscheiden worden. De techniek is in staat meer varianten te onderscheiden, naar mate de kationen buffer langzamer door de kolom stroomt. De geautomatiseerde HPLC techniek die tegenwoordig veelal gebruikt wordt, is van hoge kwaliteit en matig snel. Voor de neonatale screening op SCZ in ons land wordt gebruik gemaakt van een geautomatiseerde HPLC techniek met een relatieve korte doorlooptijd. Het definitief vaststellen van de aard van de variant gebeurt door middel van bevestiging door een alternatieve techniek.

Bij vermoeden van **α -thalassemie** kan diagnostiek worden uitgebreid met:

- 4) Gap-PCR voor diagnostiek van 7 van de meest voorkomende oorzaken van α -thalassemie (figuur 4)

Dit volledige pakket heeft Sanquin aanvraagcode B002,

apart Hb, HbA₂ en HbF onderzoek heeft aanvraagcode B010,

apart α -thalassemie onderzoek de code B003.

In **zeldzame gevallen** kunnen afwijkende Hb-vormen niet worden gescheiden via HPLC techniek, is het percentage HbA₂ niet indicatief bij beta-thalassaemia minor of valt de oorzaak van alfa-thalassemie niet binnen de scope van de screening. In deze uitzonderlijke gevallen kan in overleg met de inzender vervolgonderzoek worden ingezet. Dit betreft:

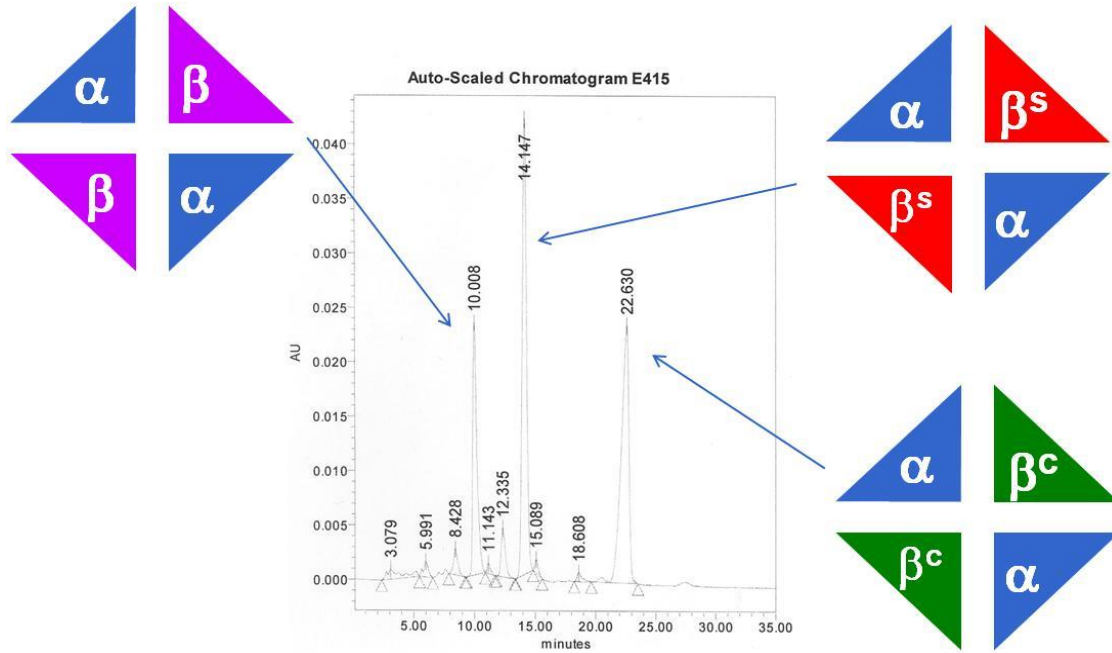
- 5) Bepaling van synthese van α en β -globine in reticulocyten tbv thalassemie (figuur 3)
- 6) Bepaling van deleties in alfa, en beta-genencluster mbv MLPA tbv thalassemie (figuur 5)
- 7) DNA-sequencing van α en/of β -globinegenen tbv thalassemie en afwijkende Hb-vormen

Literatuur

Haemoglobinopathy Diagnosis by Barbara J.Bain, Blackwell Publishing Ltd 2006

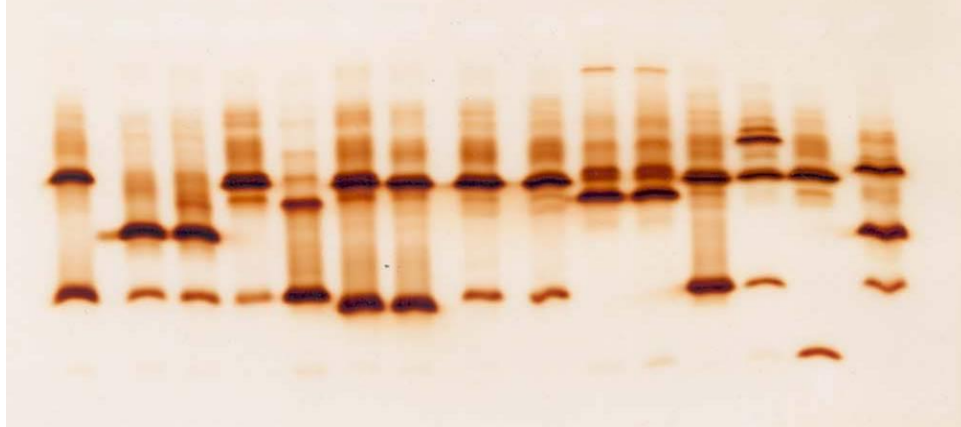
Figuur 1

Hb-scheiding via kationenwisselaar en HPLC



Figuur 2

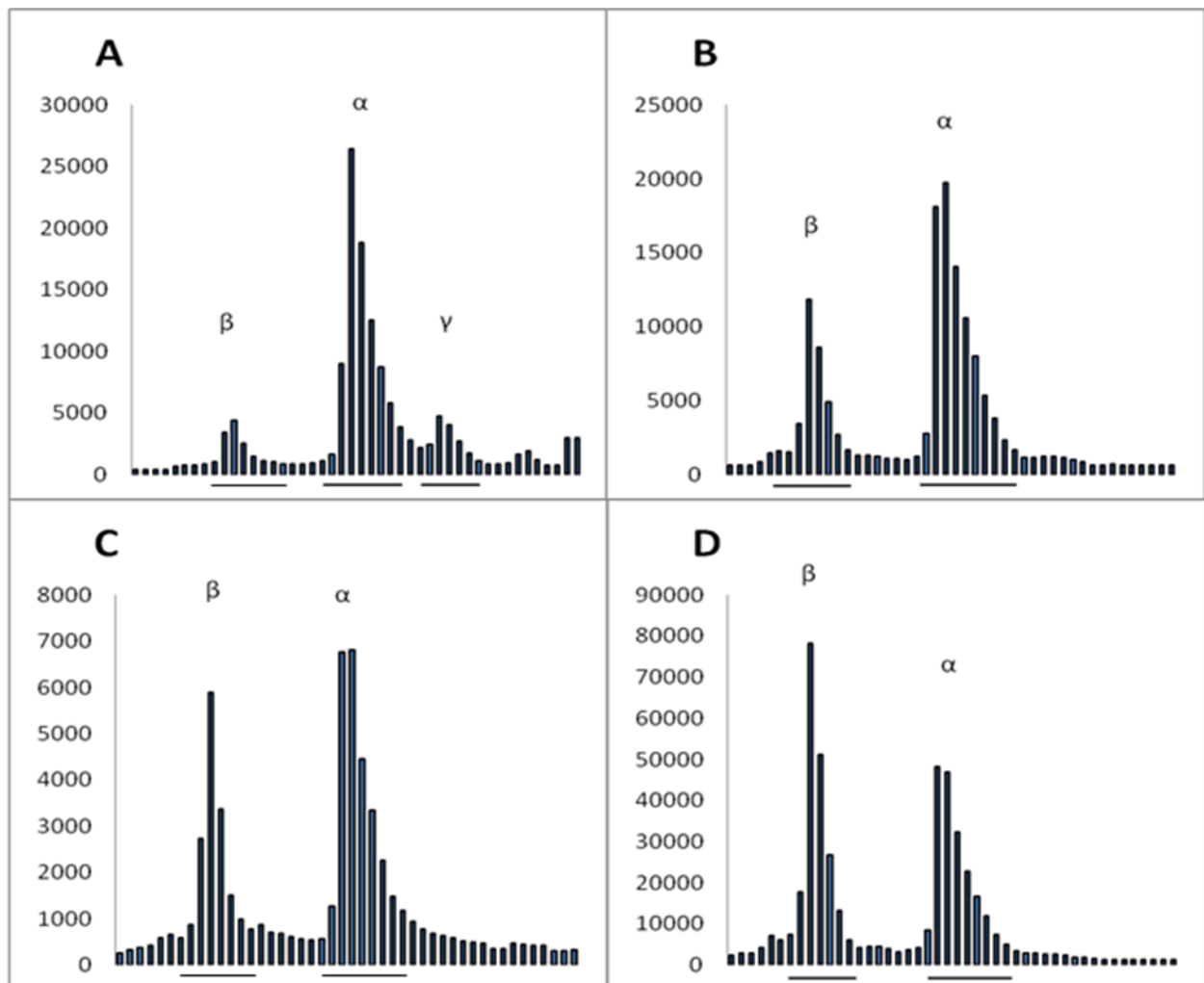
Iso Electric Focussing van hemoglobine



Figuur 3

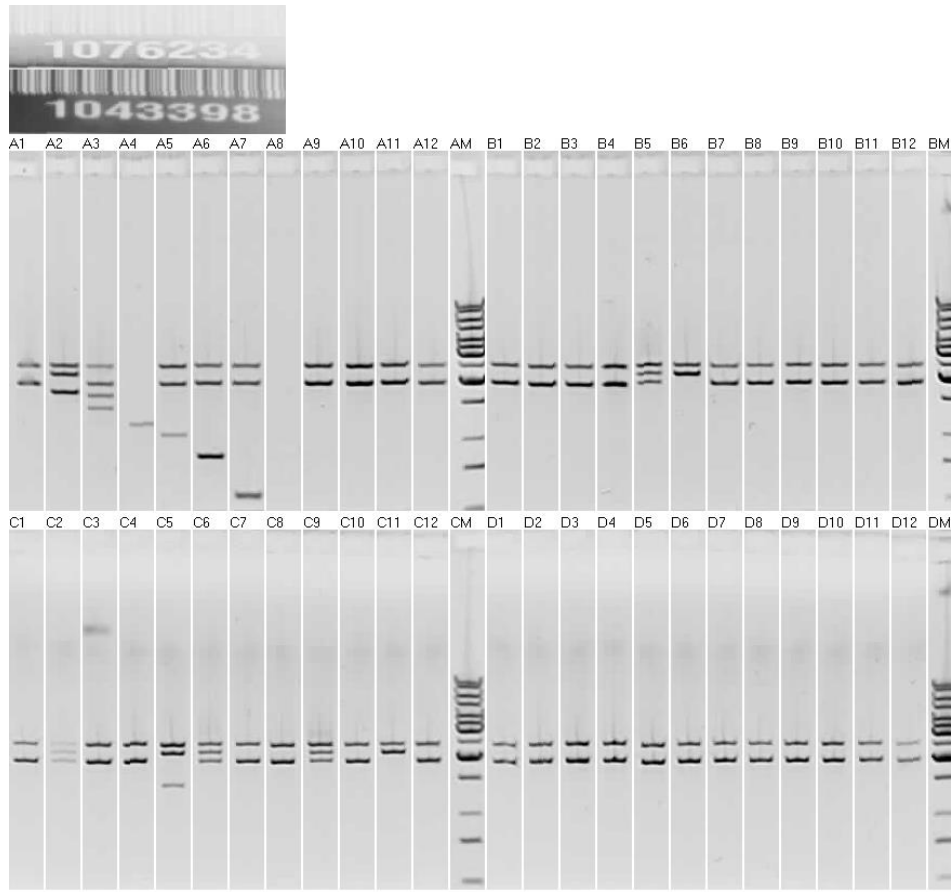
Familie-onderzoek hemoglobin-ketensynthese in reticulocyten

A) β -thalassemia major, B) moeder van A (β -minor), C) vader van A (β -minor), D) gezonde controle met verhouding $\beta:\alpha=1$)



Figuur 4

Gap-PCR voor diagnostiek van 7 van de meest voorkomende oorzaken van α -thalassemie



Figuur 5

