

Uit de laboratoriumpraktijk

Een vermoeide Aziatische vrouw

G. den BESTEN, J. OTTEN en R.J. SLINGERLAND

Een 30-jarige Aziatische vrouw presenteerde zich in het ziekenhuis Isala met vermoeidheidsklachten die al jaren bestonden. De patiënt is bekend met een persisterende hypochrome microcytaire anemie en is in het verleden behandeld met ijzersuppletie. Bij herhaling van het bloedbeeld werd een laag Hb, MCV en MCH gevonden bij een verhoogde ferritine concentratie. Op basis van de laboratoriumuitslagen en etniciteit van de patiënt werd er hemoglobinopathie onderzoek ingezet. Met behulp van multiplex PCR en capillaire elektroforese werd de diagnose hemoglobine H (HbH)-ziekte (genotype $--^{SEA}/-\alpha^{3,7}$) gesteld. Familieonderzoek liet zien dat de vader (genotype $--^{SEA}/\alpha\alpha$) en moeder (genotype $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$) beiden α -thalassemie dragers zijn en dat er dus een genetisch risico van 25% is dat het nageslacht de HbH-ziekte heeft. Met behulp van het flowdiagram opgesteld door de werkgroep hemoglobinopathieën (HbP) van de Vereniging Hematologische Laboratoriumdiagnostiek kunnen (dragers van) HbP snel en accuraat worden opgespoord. In combinatie met genetische counseling kan hiermee de kans op ernstige HbP in het nageslacht worden verkleind.

Casus

Een 30-jarige Aziatische vrouw werd door de huisarts doorverwezen naar het Isala ziekenhuis te Zwolle vanwege al jaren bestaande vermoeidheidsklachten. De patiënt is bekend met een persisterend laag hemoglobine (Hb) van 5,3 - 5,7 mmol/l (ref. waarde: 7,5 - 10,0 mmol/l), MCV van 63 - 67 fl (ref. waarde: 80 - 100 fl) en een verhoogd ferritine van 276 - 317 μ g/l (ref. waarde: 10 - 150 μ g/l) zonder tekenen van veel bloedverlies tijdens de menstruatie. De anamnese toonde een vermoeide, niet zieke jonge vrouw met naast een bestaande hooikoorts geen specifieke klachten of afwijkingen. Er was geen sprake van recent medicatiegebruik, wel heeft de patiënt zes jaar geleden mogelijk ijzertabletten gehad van de huisarts. De familieanamnese is blanco voor de vader en moeder, echter haar oudere broer is eveneens bekend met ernstige vermoeidheidsklachten en heeft waarschijnlijk eenmalig een bloedtransfusie in het verleden gehad. Bij het lichamenlijk onderzoek werden geen bijzonderheden gevonden, de echo van het abdomen liet een licht vergrote milt zien. Bloedonderzoek leverde een hypochrome micro-

cytaire anemie op met normale trombocyt- en leukocytenconcentraties en een hoog normaal aantal reticulocyten (tabel 1). De ijzerparameters waren binnen de referentiewaarden, met uitzondering van de reeds bekende verhoogde ferritineconcentratie (tabel 1). LDH en bilirubine waren niet verhoogd maar haptoglobine was sterk verlaagd, wat mogelijk wijst op intravasale hemolyse. De directe antiglobulinetest was negatief en microscopisch onderzoek liet geen additionele afwijkingen zien. Verdere laboratoriumuitslagen lieten een normale nierfunctie, schildklier, CRP, foliumzuur en vitamine B12 zien. Op basis van de persisterende microcytaire anemie en de familieanamnese werd hemoglobinopathie onderzoek aangevraagd. Hierbij werd de patiënt onderzocht op de zeven meest voorkomende α -gen deleties ($-\alpha^{FIL}$, $-(\alpha)^{20,5}$, $-\alpha^{MED}$, $-\alpha^{SEA}$, $-\alpha^{THAI}$, $-\alpha^{4,2}$ en $-\alpha^{3,7}$) met behulp van multiplex PCR en op afwijkingen in het hemoglobinepatroon door middel van capillaire elektroforese (Minicap, Sebia, Evry Cedex, Frankrijk). Er werd één α -gen deletie ($-\alpha^{3,7}$) op het ene chromosoom en één deletie ($-\alpha^{SEA}$) van twee α -genen op het andere chromosoom gevonden. Dit resulteert in slechts één functioneel α -gen met het genotype $--^{SEA}/-\alpha^{3,7}$. Het hemoglobine-

Tabel 1. Laboratoriumuitslagen van de patiënt

Bepaling	Resultaat	Referentiewaarden
Hemoglobine	5,7 ↓	7,5 - 10,0 mmol/l
Erytrocyten	4,5	4,0 - 5,3 $\times 10^{12}/l$
Hematocriet	0,30 ↓	0,36 - 0,47 l/l
MCV	68 ↓	80 - 100 fl
MCH	1261 ↓	1600 - 2100 amol
Leukocyten	7,6	4,0 - 10,0 $\times 10^9/l$
Trombocyten	239	150 - 400 $\times 10^9/l$
Reticulocyten	30	7 - 30 ‰
LDH	234	50 - 250 U/l
Bilirubine	14	<17 μ mol/l
Haptoglobine	<0,05 ↓	0,30 - 2,00 g/l
CRP	<1,0	<5,0 mg/l
IJzer	19	10 - 25 μ mol/l
IJzerverzadiging	37	20 - 50 %
Transferrine	2,2	2,1 - 3,6 g/l
TIJBC	50	45 - 80 μ mol Fe/l
Ferritine	426 ↑	10 - 150 μ g/l

MCV = mean corpuscular volume

MCH = mean corpuscular hemoglobine

TIJBC = totale ijzerbindingscapaciteit

Klinisch Chemisch Laboratorium, Isala, Zwolle

E-mail: g.den.besten@isala.nl

patroon liet een HbH- en HbBart's-fractie zien met een verlaagde HbA₂-piek (figuur 1). Het gevonden genotype en hemoglobinepatroon past bij het fenotype van de HbH-ziekte. In verband met het mogelijk aanwezige genetische risico voor ernstige vormen van hemoglobinopathie in het nageslacht, wordt bij HbH-ziekte geadviseerd om de eventuele partner en familie op hemoglobinopathieën te laten controleren. Familieonderzoek toonde aan dat de moeder (heterozygote α^+ -thalassemie met genotype $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) en de vader (heterozygote α^0 -thalassemie met genotype $--^{SEA}/\alpha\alpha$) beiden α -thalassemie dragers waren en dat er dus een genetisch risico van 25% is dat het nageslacht de HbH-ziekte (genotype $--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$) gediagnosticeerd.

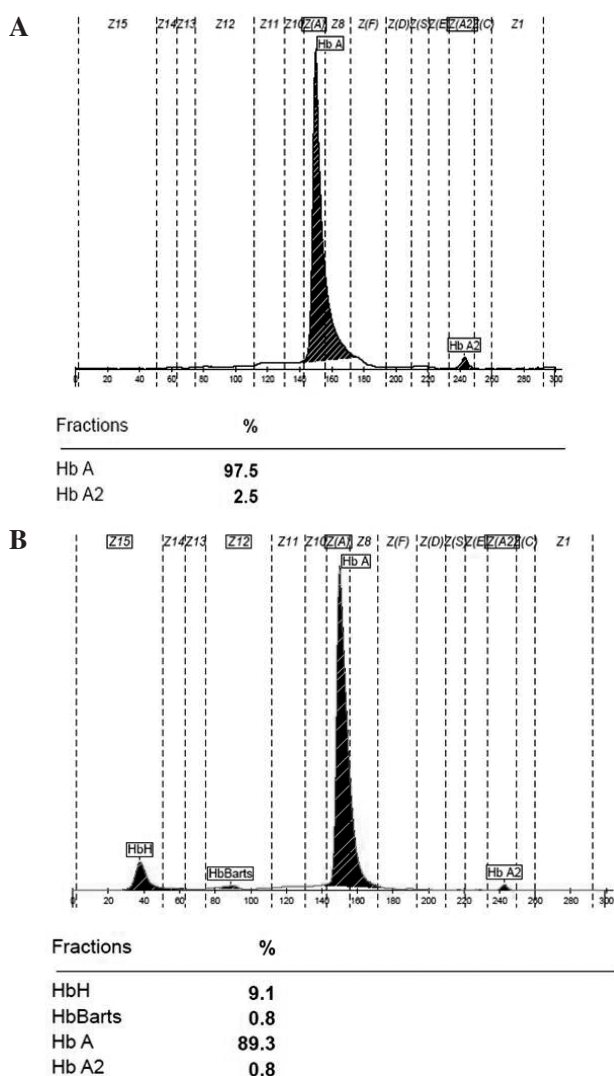
Terugkijkend was het al 10 jaar geleden dat de patiënt voor het eerst geprikt was. Bij de toen ook aanwezige hypochrome microcytaire anemie is door het laboratorium advies gegeven om hemoglobinopathie onderzoek uit te laten voeren. Zoals later bleek is dit onderzoek

niet uitgevoerd (de reden hiervoor is ons onbekend). Pas 10 jaar later, na het veranderen van huisarts, is de patiënt doorgestuurd naar de internist. De uitkomst daarvan is zoals hiervoor beschreven.

Bespreking

Hemoglobinopathieën

Het hemoglobinepatroon bij mensen ouder dan 1 jaar bestaat voornamelijk uit tetrameren van twee α - en twee β -ketens (HbA: ~97,5%), twee α - en twee δ -ketens (HbA₂, ~2,5%) en twee α - en twee γ -ketens (HbF: <0,5%) (1). De synthese van α -ketens wordt geregeld door vier α -genen, die gelokaliseerd zijn op beide chromosomen 16. De synthese van de β -, δ - en γ -ketens wordt elk geregeld door twee genen gelokaliseerd op beide chromosomen 11. Onder de verzamelnaam hemoglobinopathieën (HbP) vallen de afwijkingen in de aanmaak (thalassemieën) of in de functionaliteit (abnormale/varianten hemoglobines) van de verschillende globineketens (2). Thalassemieën zijn hoofdzakelijk onderverdeeld in α - en β -thalassemie naar het gen wat minder tot expressie komt. Dragers van thalassemieën vertonen meestal weinig tot geen klinische symptomen en worden gekenmerkt door een milde chronische hypochrome microcytaire anemie. Homozygotie of samengestelde heterozygotie voor mutaties in de globinegenen kunnen leiden tot ernstige vormen van thalassemieën. Deze ernstige vormen kunnen niet levensvatbaar (hydrops foetalis syndroom waarbij geen α -genen tot expressie komen) of transfusieafhankelijk (β -thalassemie major waarbij er verminderde of afwezige β -genexpressie is) zijn. Abnormale hemoglobines worden voornamelijk gevonden van het β -gen waarbij de meest bekende varianten de HbS, HbC, HbD, HbO^{Arab} en HbE zijn (3). HbS is wereldwijd de meest voorkomende abnormale hemoglobine en is de veroorzaker van sikkelcelziekte. HbP zijn de meest voorkomende autosomaal recessieve ziekten die zich geografisch steeds meer verspreiden van de traditionele gebieden (Noord-Afrika, Middellandse Zeegebied en Zuidoost Azië) naar Noord-Europa, de Verenigde Staten en de rest van de wereld. In Nederland heeft het merendeel van de hemoglobinopathie dragers een HbS variant, gevolgd door een α -thalassemie en β -thalassemie (4). Bij de laatste peildatum in 2004 woonde er naar schatting in Nederland minstens 180.000 dragers van HbP en 1.250 patiënten met sikkelcelziekte of thalassemie intermedia/major (5). Pas vanaf 2007 wordt er in de hielprikscreening gescreend op sikkelcelziekte en op de ernstigste vormen van thalassemie (HbH-ziekte en homozygote β -thalassemie). HbS-dragers, thalassemie dragers en dragers van Hb-varianten worden echter niet gerapporteerd (6). Ook de toenemende aantallen vluchtelingen uit potentieel risicovolle gebieden voor HbP zullen de huidige situatie veranderen. Deze mensen arriveren vaak zonder medische informatie en in hun land van herkomst wordt meestal geen hielprikscreening vergelijkbaar met die in Nederland uitgevoerd. Er gaan stemmen op om deze mensen preventief te screenen op HbP (en eventueel andere aangeboren ziekten) om zo toekomstige overdiagnostiek en overbehandeling te



Figuur 1. Elektroferogram van de capillaire elektroforese analyse. (A) Het chromatogram van een niet afwijkend hemoglobinepatroon met de HbA (ref. waarde: 96,7 - 97,7%) en HbA₂ (ref. waarde: 2,3 - 3,3%) pieken. (B) Het chromatogram van de HbH patiënt toont de extra pieken van HbH (ref. waarde: niet aantoonbaar) en HbBart's (ref. waarde: niet aantoonbaar) en een verlaagde HbA₂ piek.

voorkomen. Dit alles bij elkaar maakt dat de bestaande getallen waarschijnlijk onderhevig zijn aan een sterke onderrapportage.

HbH-ziekte

Een ernstige vorm van α -thalassemie is de Hemoglobine H (HbH)-ziekte waarbij er door deleties drie van de vier α -genen missen, waardoor er slechts één functioneel α -gen overblijft. De meest voorkomende oorzaak is een compound heterozygotie voor een α^+ - en een α^0 -thalassemie zoals $--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$, $--^{SEA}/-\alpha^{4.2}$, $--^{MED}/-\alpha^{3.7}$ of $-(\alpha)^{20.5}/-\alpha^{3.7}$ (7). Het is belangrijk om hierbij te realiseren dat de deleties $-\alpha^{3.7}$ en $-\alpha^{4.2}$ ieder apart resulteren in een veranderd maar nog wel functionerend α -gen, waarbij de deleties $-\alpha^{SEA}$, $-\alpha^{MED}$, $-\alpha^{FIL}$, $-\alpha^{THAI}$ en $-(\alpha)^{20.5}$ dubbele α -gen deleties in cis zijn en resulteren in nul functionerende α -genen. Bijvoorbeeld, het genotype $--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$ resulteert in één functionerend α -gen terwijl het genotype $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$ twee functionerende α -genen heeft. HbH-ziekte komt voornamelijk voor bij mensen afkomstig uit Zuidoost Azië of het Middellandse Zeegebied. De sterk verminderde α -globine productie leidt tot een hypochrome microcytaire anemie. Door de verminderde α -globine productie ontstaat er een overschot aan β -globines die samen een abnormaal hemoglobine vormen. Deze β -tetrameren worden hemoglobine H (HbH) genoemd en zijn erg onstabiel. Door versnelde oxidatie van de β -ketens ontstaat er erythrocytmembraanschade, intravasale erythrocytfragmentatie en chronische (intravasale) hemolytische anemie. Het intravasaal vrijgekomen Hb wordt weggevangen door haptoglobine, waarna het haptoglobine-hemoglobinecomplex wordt afgebroken in de lever. Bij ernstige acute of chronische hemolyse kan dit leiden tot verlaagde plasma haptoglobine concentraties. In de erythrocyt kan HbH neerslaan en soms microscopisch worden waargenomen als inclusielichaampjes. HbH heeft door de missende heem-heem interactie een hyperbole in plaats van sigmoïde zuurstofdissociatie curve. Dit leidt tot een hoge zuurstofaffiniteit en een verminderde zuurstofafgifte aan de weefsels, wat kan resulteren in de hemoglobinopathie-karakteriserende ischemie crises (1). Bij HbH-ziekte kunnen er ook HbBart's worden gevormd. Deze tetrameren bestaan alleen uit γ -ketens en worden door de afwezigheid van de α -genen voornamelijk gezien bij het hydrops foetalis syndroom. Ook HbBart's hebben een hoge zuurstofaffiniteit en een sigmoïde zuurstofdissociatie curve door de missende heem-heem interactie (1). Bij HbH-ziekte is de erythropoëse nog redelijk effectief, maar wordt de anemie voornamelijk veroorzaakt door de kortere levensduur van de erythrocyten. Vaak wordt er bij een ernstige HbP ook een verhoogd plasma ferritine gevonden. Een mogelijk mechanisme hiervoor is dat als reactie op de anemie de erythropoëse wordt verhoogd wat leidt tot een onderdrukking van hepcidine (8). Hierdoor zal de ijzerabsorptie uit het maag-darmkanaal worden gestimuleerd. In sommige gevallen kan er secundaire hemochromatose ontstaan doordat er meer ijzer wordt geabsorbeerd dan dat er nodig is voor de erythropoëse. In het bloedbeeld reflecteert dit in een verhoging van het plasma ferritine. Dit betekent dat ook bij HbP

waarbij nog geen bloedtransfusie of ijzersuppletie is gegeven er een verhoogd plasma ferritine gevonden kan worden.

Klinisch wordt de HbH-ziekte voornamelijk gekenmerkt door anemie, splenomegalie en soms door icterus (9). De anemie kan worden versterkt door infecties, zwangerschap of door oxiderende medicatie zoals sulfonamides. De ernst van de klinische symptomen verschilt sterk tussen patiënten en kan variëren van relatief mild tot zeer ernstig, waarbij reguliere bloedtransfusies en splenectomie nodig kunnen zijn. Behandeling bestaat in de meeste gevallen uit foliumzuursuppletie vanwege de hoge turnover van erythrocyten. Ijzersuppletie moet in verband met de extra kans op ijzerstapeling vermeden worden (4).

Laboratoriumdiagnostiek

De richtlijn voor basale laboratoriumdiagnostiek bij HbP is tot stand gekomen door de Landelijke Werkgroep Hemoglobinopathieën (LWH) binnen de Vereniging voor Hematologische Laboratoriumdiagnostiek (VHL) en is opgebouwd uit drie stappen: hematologische analyse, scheiding van hemoglobinefracties en DNA analyse (10, 11). Bij de eerste stap wordt er getest op een hypochroom microcytair bloedbeeld. Dit kan zowel gepaard gaan met of zonder een anemie. Daarnaast is de combinatie met een normale ijzerstatus of een persisterend microcytair bloedbeeld na ijzersuppletie een sterke indicatie voor HbP. Ook patiënten zonder duidelijk afwijkende bloedparameters, maar met een positieve familiegeschiedenis voor HbP en/of vanwege hun etniciteit hebben een verhoogde dragerschapkans. Een andere groep patiënten kan worden opgepikt via een discrepantie tussen de glucose en de HbA1c uitslagen. Zoals ook recent beschreven in het NTKC (12), kunnen bepaalde hemoglobinevarianten met kation-uitwisselingschromatografie samenvallen met de HbA1c piek waardoor er vals verhoogde HbA1c waarden gemeten worden. Sommige analyseapparatuur generen specifieke HbP flags wanneer een monster wordt verdacht van een hemoglobinopathie, maar ook hier worden niet alle HbP opgepikt (12). Hierdoor is dan ook het advies om bij discrepanties tussen de HbA1c en de gemeten glucose concentraties HbA1c op een alternatieve manier te meten (bijvoorbeeld door middel van een immuno-assay of affiniteitschromatografie) en de patiënt te screenen op HbP. Met behulp van de tweede stap, waarbij biochemische scheiding van de hemoglobine fracties plaatsvindt, kunnen de meeste thalassemieën en abnormale hemoglobines gevonden worden. Bij de derde stap kunnen vervolgens op DNA niveau de deleties en/of mutaties met zekerheid worden aangetoond. In de meeste laboratoria wordt er op DNA niveau alleen gekeken naar de zeven meest voorkomen α -gen deleties. Hiermee worden ongeveer 80% van de α -thalassemieën gevonden (10). Indien alle testen negatief zijn en er klinisch een sterke verdenking voor HbP blijft bestaan, of als er vanwege het inschatten van het genetische risico behoefte bestaat om dit met zekerheid te bevestigen dan wel uit te sluiten, kan er in gespecialiseerde laboratoria (bijvoorbeeld het Nederlands Referentie Laboratorium voor onderzoek

en diagnostiek van Hemoglobinopathieën te Leiden) met behulp van direct sequencing of *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) gekeken worden naar puntmutaties en/of (on)bekende deleties (3). Vanwege de hoge kosten en het vaak minieme effect op de klinische behandeling worden deze verdere onderzoeken in lang niet alle gevallen uitgevoerd. Dit betekent dat een grote groep mensen bestaat van wie niet bekend is dat ze een hemoglobinopathie hebben of welke hemoglobinopathie ze precies hebben. Op advies van de LWH dient er bij een gevonden thalassemie, variant of dragerschap hiervan gewezen te worden op de mogelijkheid van een genetisch risico voor ernstige vormen van HbP en daarom, afhankelijk van de leeftijd, de ouders, partner en nageslacht op HbP te laten controleren. Hiervoor wordt de patiënt vaak doorverwezen naar de klinisch geneticus.

Conclusie

Bij een persisterend hypochroom microcytair bloedbeeld met een normale ijzerstatus moet er altijd aan HbP gedacht worden. Ook bij discrepanties tussen glucose en HbA1c uitslagen moet men bedacht zijn op mogelijke aanwezigheid van HbP. Door een snelle diagnose kan schade aan de patiënt worden voorkomen, kan er op tijd genetische risico informatie worden gegeven en kunnen daarmee eventuele toekomstige problemen worden voorkomen. Door de stijgende incidentie binnen de Nederlandse bevolking zijn HbP al minder exotisch dan vroeger. Hierdoor gaan er al stemmen op om bij genetisch-risicovolle echtparen met een kinderwens te gaan screenen op HbP om zo de kans op ernstige HbP in het nageslacht te verkleinen. Daarnaast moet er worden nagedacht over het preventief screenen op HbP in de groter wordende groep vluchtelingen. Deze mensen komen vaak uit hemoglobinopathie-risicovolle gebieden, zonder medische informatie en er wordt in het land van herkomst meestal geen hielprikscreening vergelijkbaar met die in Nederland uitgevoerd.

Referenties

1. Bain BJ. Haemoglobinopathy Diagnosis, Blackwell Science, 2005.
2. Kusters E, Kerkhoffs JLH, Rossum AP van. Labquiz. De diagnostiek van thalassemieën. Ned Tijdschr Geneesk. 2014; 158: A7988A.

3. Giordano PC. Strategies for basic laboratory diagnostics of the hemoglobinopathies in multi-ethnic societies: interpretation of results and pitfalls. Int J Lab Hematol. 2013; 35: 465-479.
4. Hartevelde CL. Hemoglobinopathie in Nederland: een exoot op klompen. Ned Tijdschr Hematol. 2014; 11: 44-54.
5. Giordano PC, Hartevelde CL. Preventie van erfelijke hemoglobinopathieën in Nederland. Ned Tijdschr Geneesk. 2006; 150: 2137-2141.
6. RIVM. Draaiboek neonatale hielprikscreening versie 9.1. Bilthoven: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu - Centrum voor Bevolkingsonderzoek; december 2013.
7. Chui DH. Alpha-thalassemia: Hb H disease and Hb Barts hydrops fetalis. Ann N Y Acad Sci. 2005; 1054: 25-32.
8. Sheeran C, Weekes K, Shaw J, Pasricha SS. Complications of HbH disease in adulthood. Br J Haematol. 2014; 167: 136-139.
9. Martin A, Thompson AA. Thalassemië. Pediatr Clin North Am. 2013; 60: 1383-1391.
10. VHL. Aanbeveling hemoglobinopathieonderzoek in de praktijk. Vereniging Hematologische Laboratoriumdiagnostiek; 2003.
11. Giordano PC, Smit JW, Herruer M, Huisman W, Pouwels JGJ, Verhoef N, Idema RN, et al. Dragerschapdiagnostiek en preventie van sikkelcelziekte en thalassemie major; aanbevelingen van de werkgroep Hemoglobinopathieën. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk. 2006; 31: 301-305.
12. Oyaert MND, Hartevelde CL, Verstreken I, Celen HJB, Desmet KJO, Kieffer DMJ. Een patiënt met een sterk verhoogde HbA1c waarde. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk. 2015; 40: 198-200.

Summary

den Besten G, Otten J, Slingerland RJ. A tired Asian woman. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk. 2016; 41: 180-183.

A 30-year old Asian woman with long-standing complaints of fatigue and a known iron-resistant hypochromic microcytic anemia was referred to the hospital. The blood count showed a low Hb, low MCV and a low MCH with an elevated serum ferritin concentration. The laboratory results and high-risk ethnicity of the patient suggested the presence of a hemoglobinopathy. Multiplex PCR and capillary electrophoresis confirmed the diagnosis HbH-disease (genotype --^{SEA}/- $\alpha^{3.7}$). Examination of the family members showed that both the mother (genotype - $\alpha^{3.7}$ / $\alpha\alpha$) and the father (genotype --^{SEA}/ $\alpha\alpha$) were α -thalassemia carriers. This combination creates a genetic risk of 25% of having children with HbH-disease. The standard diagnostic protocol that was developed by the hemoglobinopathy working party of the Vereniging Hematologische Laboratoriumdiagnostiek is a good guidance to quickly and accurately detect (carriers of) hemoglobinopathies. In combination with genetic risk counseling, this information can be used to prevent severe hemoglobinopathies in the posterity.