

CAT **Critically Appraised Topic**

Nut van moleculaire diagnostiek bij α - en β -thalassemie

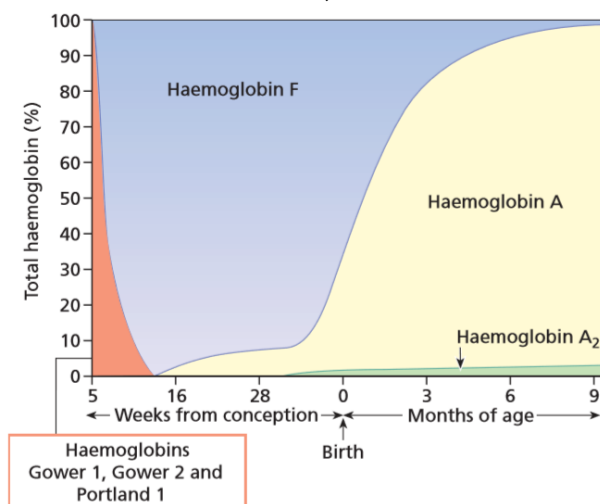
Author: Eveline Vancraeynest
 Supervisor: Dr. H. Claerhout
 Search/methodology verified by: Dr. H. Claerhout
 Date: 18 februari 2020

CLINICAL BOTTOM LINE

Moleculaire diagnostiek voor α -thalassemie dient steeds te worden verricht ter confirmatie gezien α^0 - en α^+ -thalassemie niet kunnen worden onderscheiden door middel van eerstelijns onderzoeken. Voor β -thalassemie zijn de indicaties breder, moleculaire diagnostiek wordt hier voornamelijk aangewend in kader van prenatale diagnostiek, onduidelijke diagnose via eerstelijns onderzoeken en voor definitieve diagnostiek bij mogelijke dragers en gestegen HbA₂. Voor α -thalassemie worden GAP-PCR en Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) meestal aangewend voor deleties en PCR-gebaseerde technieken voor puntmutaties. Met PCR-gebaseerde technieken worden meer dan 90% van de varianten teruggevonden bij β -thalassemie. Indien ongekende varianten niet worden gedetecteerd na verdere screening, kan directe DNA sequencing worden verricht voor puntmutaties en MLPA voor deleties. Next generation sequencing (NGS) wordt nog niet routinematig gebruikt. Uit een elektronische bevraging gericht aan 18 klinische laboratoria in België en Nederland waar moleculaire diagnostiek wordt verricht voor α - en/of β -thalassemie, zagen we dat Sanger sequencing, (multiplex) GAP-PCR en MLPA voornamelijk worden gebruikt voor α -thalassemie. Voor β -thalassemie is dit hoofdzakelijk Sanger sequencing en in tweede instantie MLPA. Een retrospectieve analyse werd verricht van patiënten bij wie tussen 2014 en 2018 een MLPA voor α -thalassemie werd uitgevoerd in UZ Leuven. Vijftig procent (58/117) van al onze patiënten werden gediagnosticeerd met een α -thalassemie op basis van MLPA, 18 patiënten hadden een HbS. Alpha-thalassemie werd vastgesteld bij 25% (25/99) van de patiënten met een verlaagd HbA₂ en bij 56% (55/99) met een normaal HbA₂. Indien een onderliggende hemoglobine variant aanwezig was, kon HbA₂ niet betrouwbaar worden geïnterpreteerd. Bij patiënten met een HbS in combinatie met een onderliggende α -thalassemie, zagen we statistisch significant hogere HbA₂ waarden ($p=0.02$) in vergelijking met patiënten zonder onderliggende α -thalassemie.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Hemoglobinopathiën (Hbp) zijn de meest frequente monogene autosomaal recessieve aandoeningen.^{1,2,3} Vijf tot zeven procent van de wereldbevolking is drager van een Hbp waarvan 2.9% voor thalassemie.^{2,4} Thalassemieën worden gekenmerkt door een verminderde of afwezige productie van globineketens van hemoglobine met als gevolg een onevenwichtige $\alpha\beta$ -ratio. Alle vormen van hemoglobine zijn tetrameren. HbA ($\alpha_2\beta_2$) vormt het grootste aandeel bij een gezonde volwassene (96.8-97.8%). Een kleiner aandeel wordt gevormd door HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) (2,2-3.2%). HbF ($\alpha_2\gamma_2$) wordt geproduceerd voor de geboorte en bedraagt 90-95% rond 34-36 weken amenorree met een daling van de productie rond 34 weken. Vanaf 2 weken postpartaal zien we een daling van ongeveer 3% per week om een 'steady state' te bereiken rond de leeftijd van 6 maanden van $\leq 0.5\%$.^{3,5,6}



Figuur 1: Schematische voorstelling van de gemiddelde percentages van de verschillende hemoglobines tijdens de embryonale en foetale periode en tijdens de eerste levensmaanden.⁷

Alpha-thalassemieën

Alfa-thalassemie heeft een hoge prevalentie in Afrika, het Midden-Oosten, Zuid-Oost Azië en het Middellandse zeegebied.⁸ De α -globine keten wordt gecodeerd door twee α -globine genen HBA1 en HBA2 op de korte arm van chromosoom 16 binnen de α -globine gen cluster.³ Meer dan 100 α -thalassemie varianten zijn beschreven binnen deze locus: voornamelijk deleties, maar ook puntmutaties. Alfa-thalassemie kan worden onderverdeeld in 5 fenotypes op basis van het aantal α -globine genen die geïnactiveerd zijn. (Tabel 1) De ernst van de ziekte correleert meestal met het aantal niet-functionele α -globine gen kopieën. Bij patiënten met HbH weerhouden we microcytose, chronische hemolyse en splenomegalie. Bij α^+ -thalassemie zien we meestal normale rode bloedcel waarden tot een lichte microcytose, HbA2 en HbF zijn binnen de normale grenzen. Bij α^0 -thalassemie zien we een milde anemie met lichte daling van MCV en MCH, alsook een lichte daling in HbA2 (<2,5%).^{9,10,11} De twee meest voorkomende deleties zijn $-\alpha^{3,7}$ en $-\alpha^{4,2}$ (α^+ -thalassemie), daarnaast zijn er vijf veel voorkomende deleties geassocieerd aan α^0 -thalassemie: --MED, $-(\alpha)^{20,5}$ (mediterrane) en --SEA, --FIL, --THAI in Zuid-oost Azië.³

Genotype	Fenotype
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	Normaal
$-\alpha/\alpha\alpha$ of $\alpha\alpha^{ND}/\alpha\alpha$	Alpha plus (α^+) thalassemie (heterozygoot) – ‘silent trait’
$-\alpha/-\alpha$	Alpha plus (α^+) thalassemie (homozygoot) – ‘hemoglobine trait’
$--/\alpha\alpha$	Alpha zero (α^0) thalassemie (heterozygoot) – ‘hemoglobine trait’
$--/-\alpha$	Hemoglobine H ziekte (HbH)
$--/--$	Alpha thalassemie major (homozygoot) – Hb Bart’s hydrops foetalis

Tabel 1: α -thalassemie genotypes en fenotypes

Beta-thalassemieën

Beta-thalassemie heeft een hoge prevalentie in het Middellandse zeegebied, het Indisch subcontinent, Afrika, Zuid-Oost Azië en komt zeldzaam voor in Noord-Europa.⁷

Gamma, δ - en β -globine ketens worden gecodeerd door hun gelijknamende genen (γ , δ and β) gelokaliseerd op de korte arm van chromosoom 11 binnen de β -gencluster.³ Binnen deze cluster zijn meer dan 280 genetische variaties beschreven. In tegenstelling tot de α -thalassemieën betreft het voornamelijk puntmutaties.¹ Beta-thalassemieën kunnen worden onderverdeeld in 3 groepen op basis van het fenotype (tabel 2).

Ondanks de heterogeniteit van de mutaties is de mate van verhoging van het HbA2 vrij homogeen. In zeldzame gevallen (vb ‘silent β -thalassemie en $\beta\delta$ -thalassemie) is deze verhoging niet homogeen, en kan diagnostiek op DNA-niveau worden voortgezet.^{12,13}

	β -thalassemie minor	β -thalassemie intermedia	β -thalassemie major (Cooley’s anemie)
Overerving	Heterozygoot	Mild homozygoot of samengesteld heterozygoot	Homozygoot of samengesteld heterozygoot
Genotype	β^0 , β^+ , β^{++}	β^0/β^+ , β^+/ β^+ , β^+/ β^{++} , β^0/β^0 + beïnvloedende factoren	β^0/β^0 , β^+/ β^0 , β^+/ β^+
Leeftijd diagnose	$\pm$ 18 maanden	Heterogeen : 11% <1j, 33% 1-2j, 59% >2j	$\pm$ 3-6 maanden
Bloedbeeld	Milde microcytaire hypochrome anemie	Heterogeen: milde-matige anemie	Ernstige microcytaire hypochrome anemie Poikilocytose, target cells, erythroblasten Ernstige hemolyse
Klinisch	Geen symptomen	Heterogeen: geen tot ernstige symptomen Variabele transfusienood	Ernstig ziek (ijzeroverbelasting, multiorgaanfalen) Transfusienood
Hb-elektroforese	HbA2 > 3.2% HbF 0.5-6%	Variabel HbA2 HbF tot 100%	Variabel HbA2 HbF 70-90%

Tabel 2: Onderverdeling en kenmerken van de verschillende β -thalassemie fenotypes.^{2,14,15,16}

Diagnostiek van α - en β -thalassemieën

Van alle genetische aandoeningen, zijn Hbp uniek in het feit dat dragerschap kan worden aangetoond door middel van hematologische en biochemische testen. Indicaties voor diagnostiek zijn screening (pre-conceptioneel, antenataal, neonataal en pre-operatief/pre-anesthesie) en een afwijkend hematologisch bilan (RBC parameters en/of morfologie suggestief voor Hbp).^{5,17} In eerste lijn worden biochemische hematologische onderzoeken verricht bestaande uit een complete blood count (CBC) met Hb, RBC, MCV, MCH, RDW alsook nazicht van de ijzerstatus (Fe, ferritine, transferrine saturatie) gezien ferriprivie een belangrijke differentiaal diagnose is voor microcytaire anemie en alsook HbA2 kan doen verlagen. (Tabel 3) Als laatste is nazicht van het hemoglobinepatroon met kwantificatie van de verschillende componenten door middel van high pressure liquid chromatography (HPLC) of capillaire zone elektroforese (CZE) geïndiceerd.¹ Morfologisch onderzoek wordt ook aanbevolen (o.a. basofiele stippeling, poikilocytose, schietschijfcellen).^{5,7,13,15} Indien er geen duidelijke diagnose wordt gevonden met de eerstelijns onderzoeken of indien een hemoglobine variant zoals HbS wordt gevonden, dan kunnen tweedelijns onderzoeken worden uitgevoerd (bijvoorbeeld sikkcelceloplosbaarheidstest, osmotische fragiliteit etc.).^{1,7,10} De diagnose van α -thalassemie dient geconfirmeerd te worden met moleculaire diagnostiek gezien er geen onderscheid kan worden gemaakt tussen α^0 - en α^+ -thalassemie door middel van eerstelijns onderzoeken.^{10,18} Voor β -thalassemie zijn de indicaties voor moleculaire diagnostiek minder duidelijk, hierop zal verder worden ingegaan in deze CAT. Meestal wordt moleculaire diagnostiek toegepast indien eerstelijns onderzoeken geen duidelijke diagnose kunnen bieden of wanneer genetische counseling is geïndiceerd bij bijvoorbeeld prenatale diagnostiek.¹⁸ Bijna alle moleculaire technieken voor het opsporen van thalassemie zijn gebaseerd op PCR. Voor α -thalassemie kan gebruikt worden gemaakt van (multiplex) GAP-PCR voor het opsporen van de 7 meest voorkomende deleties. Indien de deleties niet worden gevonden, dan kan MLPA worden toegepast voor het vinden van nog niet gekende deleties. Voor α -thalassemieën ten gevolge van puntmutaties (vb Hb Constant spring), kunnen enerzijds gerichte PCR gebaseerde onderzoeken worden gebruikt zoals amplification refractory mutation system (ARMS), restriction-endonuclease PCR (RE-PCR) en reverse dot blot analyse met allele specifieke oligonucleotide probes (ASO) of anderzijds Sanger sequencing.^{18,19} Beta-thalassemieën worden voornamelijk veroorzaakt door puntmutaties, maar ook deleties in het β -gen zijn beschreven. Gelijkaardige technieken kunnen worden aangewend als voor de diagnostiek van α -thalassemie.^{1,2,18} Array comparative genomic hybridization (aCGH) kan ook worden gebruikt voor het opsporen van breekpunten om zo meer mogelijkheden te bieden voor multiplex PCR.^{2,18} NGS zou de sensitiviteit en specificiteit voor screening naar thalassemie dragerschap kunnen verhogen.^{20,21,22} Het kan alsook een meerwaarde bieden naar detectie van nieuwe genetische afwijkingen die niet werden gevonden met bovenstaande technieken.⁸ Karakterisatie van grote α -globine deleties blijft echter een uitdaging waardoor combinatie met primaire diagnostiek geïndiceerd blijft.²³ Op heden wordt NGS in België nog niet routinematig in de praktijk gebruikt.

	Ijzerdeficiëntie	Thalassemie
Hb	NI - ↓	NI - ↓
RBC	↓	↑
MCV	↓	↓
RDW	↑↑	↑
Ferritine	↓	↑ of nl

Tabel 3: Ijzerdeficiëntie dd thalassemie⁷

QUESTION(S)

- 1) Wat is de opbrengst van moleculaire diagnostiek bij vermoeden van α -thalassemie op basis van perifeer bloedbeeld en hemoglobine elektroforese?
- 2) Welke technieken of combinatie van technieken worden momenteel gebruikt bij moleculaire diagnostiek voor β -thalassemie?
- 3) In welke gevallen wordt er moleculaire diagnostiek uitgevoerd voor β -thalassemie?

SEARCH TERMS

- 1) MeSH Database (PubMed): MeSH term:
"molecular diagnostic techniques", "thalassemia", "alpha-thalassemia", "beta-thalassemia", "hemoglobinopathies", "Denaturing Gradient Gel Electrophoresis", "sequence analysis", "High-Throughput Nucleotide Sequencing", "polymerase chain reaction", "multiplex polymerase chain reaction", "Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification", "Next-generation sequencing", "pyrosequencing"
- 2) Pubmed (Medline; from 1966), SUMSearch (<http://sumsearch.uthscsa.edu/>), National Guideline Clearinghouse (<http://www.ngc.org/>), Institute for Clinical Systems Improvement (<http://www.icsi.org/>), The National Institute for Clinical Excellence (<http://www.nice.org.uk/>), Cochrane (<http://www.update-software.com/cochrane>), Health Technology Assessment Database (<http://www.york.ac.uk/inst/crd/htahp.htm>)

“molecular diagnostic techniques”, “thalassemia”, “alpha-thalassemia”, “beta-thalassemia”, “hemoglobinopathies”, “Denaturing Gradient Gel Electrophoresis”, “sequence analysis”, “High-Throughput Nucleotide Sequencing”, “polymerase chain reaction”, “multiplex polymerase chain reaction”, “Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification”, “Next-generation sequencing”, “pyrosequencing”

- 3) National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS; <http://www.nccls.org/>), International Federation of Clinical Chemistry (IFCC; <http://www.ifcc.org/ifcc.asp>), American Diabetes Association (ADA; <http://www.diabetes.org/home.jsp>), National Diabetes Information Clearinghouse (NDIC; <http://diabetes.niddk.nih.gov/>), Westgard QC (<http://www.westgard.com>), Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA; <http://www.cms.hhs.gov/clial>)
- 4) UpToDate Online version 12.2 (2019)

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

A. Guidelines and Recommendations

Traeger-Synodinos J, Harteveld L, Old M, Petrou M, Galanello R, Giordano P et al. EMQN best practice guidelines for molecular and haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies. *Eur J Hum Genet.* 2015;23:426-437. [1]

Martinez PA, Angastiniotis M, Eleftheriou A, Gulbis B, Mañú Pereira Mdel M, Petrova-Benedict R et al. Haemoglobinopathies in Europe: health & migration policy perspectives. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9:1-7. [4]

Ryan K, , Bain BJ, Worthington D, James J, Plews D, Mason A et al. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. *Br J Haematol.* 2010;149:35-49. [5]

De Franceschi L, Bachir D, Galacteros F, Gulbis B, Voskaridou E, Ribeiro L.: Enerca wp4 sickle cell disorders haemoglobinopathies recommendations 2009 – 2012.
https://www.enerca.org/media/upload/arxiu/training/enerca_wp4_recommendations.pdf [40]

Hemoglobinopathies: Current Practices for Screening, Confirmation and Follow-up. CDC 2015.
https://www.cdc.gov/ncbddd/sicklecell/documents/nbs_hemoglobinopathy-testing_122015.pdf [45]

B. Presentation

Agarwal AM. Laboratory diagnosis of hemoglobinopathies and thalassemia. www.arup.utah.edu. [19]

C. Reviews

Harteveld CL. State of the art and new developments in molecular diagnostics for hemoglobinopathies in multiethnic societies. *Int. J. Lab. Hematol.* 2014;36:1-12. [2]

Traeger-Synodinos J and Harteveld CL. Advances in technologies for screening and diagnosis of hemoglobinopathies. *Biomark Med.* 2014;8(1):119-131. [3]

Clark BE, Thein SL. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. *Clin Lab Haematol.* 2004;26:159-176. [6]

Origa R, Moi P. Alpha-thalassemia. *GeneReviews*® 2016. [9]

Piel FB, Weatherall DJ. The α -thalassemias. *N Engl J Med.* 2014;371(20):1908-1916. [11]

Van Solinge WW, van Wijk HA, Kraaijenhagen RJ. Moleculaire diagnostiek van hemoglobinopathieën en thalassemieën. *Ned Tijdsch Klin Chem* 1996;21:176-183. [12]

Brancaleoni V, Di Pierro E, Motta I, Cappellini MD. Laboratory diagnosis of thalassemia. *Int J Lab Hematol.* 2016;38:32-40. [15]

Kohne E. Hemoglobinopathies. *Dtsch Arztebl Int.* 2011;108:532 -540. [16]

Bain BJ. Haemoglobinopathy diagnosis: algorithms, lessons and pitfalls. *Blood Rev.* 2011;25:205-211. [17]

Sabath DE. Molecular diagnosis of thalassemias and hemoglobinopathies: an ACLPS critical review. *Am J Clin Pathol.* 2017;148:6-15. [18]

Clark BE, Shooter C, Smith F, Brawand D, Thein SL. Next-generation sequencing as a tool for breakpoint analysis in rearrangements of the globin gene clusters. *Int J Lab Hematol*. 2017;39:111-120. [23]

Lam E et al, Chan C, Tsui N, Au T, Wong KF, Wong HT et al. Clinical applications of molecular technologies in Hematology. *Journal of medical diagnostic methods* 2013;2:1-6. [33]

Massalska D, Bijok J, Zimowski JG, Jozwiak A, Jakiel G, Roszkowski T. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) – new possibilities of prenatal diagnosis. *Ginekol Pol*. 2013; 84: 461-464. [35]

Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. *Genet Med*. 2010; 12(2):61-76. [43]

Mosca A, Paleari R, Ivaldi G, Galanello R, Giordano PC. The role of haemoglobin A2 testing in the diagnosis of thalassaemias and related haemoglobinopathies. *J Clin Pathol*. 2009;42:1797-1801. [46]

D. Original and research Articles

Heireman L, Luyckx A, Schynkel K, Dheedene A, Delaunoy A, Delaunoy M et al. Detection of a large novel α -thalassemia deletion in an autochthonous Belgian family. *Hemoglobin*. 2019;43:112-115. [8]

Fan DM, Yang X, Huang LM, Ouyang GJ, Yang XX, Li M. Simultaneous detection of target CNVs and SNVs of thalassemia by multiplex PCR and next-generation sequencing. *Mol Med Rep*. 2019;19:2837-2848. [20]

He J, Song W, Yang J, Lu S, Yuan Y, Guo J et al. Next-generation sequencing improves thalassemia carrier screening among premarital adults in a high prevalence population: the Dai nationality, China. *Genet Med*. 2017;19:1022-1031. [21]

Shang X, Peng Z, Ye Y, Asan, Zhang X, Chen Y et al. Rapid targeted next-generation sequencing platform for molecular screening and clinical genotyping in subjects with hemoglobinopathies. *EbioMedicine*. 2017;23:150-159. [22]

Head CE, Conroy M, Jarvis M, Phelan L, Bain BJ. Some observations on the measurement of haemoglobin A2 and S percentages by high performance liquid chromatography in the presence and absence of α thalassaemia. *J Clin Pathol*. 2004;57:276-280. [24]

Kanavakis E, Traeger-Synodinos J, Vrettou C, Maragoudaki E, Tzetis M, Kattamis C. Prenatal diagnosis of the thalassaemia syndromes by rapid DNA analytical methods. *Mol Hum Reprod*. 1997;3(6):523–528. [26]

Vrettou C, Traeger-Synodinos J, Tzetis M, Malamis G, Kanavakis E. Rapid screening of multiple [beta]-globin gene mutations by real-time PCR on the LightCycler: Application to carrier screening and prenatal diagnosis of thalassemia syndromes. *Clin Chem*. 2003;49:769-776. [27]

Ke L-Y, Chang JG, Chang CS, Hsieh LL, Liu TCI. Rapid screening for deleted form of β -thalassemia by real-time quantitative PCR. *J Clin Lab Anal*. 2017;31: 1-6. [28]

Winichagoon P, Saechan V, Sripanich R, Nopparatana C, Kanokpongsakdi S, Maggio A et al. Prenatal diagnosis of β -thalassaemia by reverse dot-blot hybridization. *Prenat Diagn*. 1999;19(5):428-435. [29]

Gorakshaker AC, Lulla CP, Nadkarni AH, Pawar AR, Desai SN, Colah RB, Mohanty D. Prenatal diagnosis of β -thalassemia using denaturing gradient gel electrophoresis among Indians. *Hemoglobin*. 1997;21:421–435. [30]

Chassanidis C, Boutou E, Voskaridou E, Balassopoulou A. Development of a high-resolution melting approach for scanning beta globin gene point mutations in the Greek and other Mediterranean populations. *PLoS One*. 2016;11(6):1-22. [31]

Ho S.S.Y, Huan PT, Leow GH, Ching LK, Chiu L, Law HY, Koay ES. Rapid prenatal diagnosis of common beta-thalassemia mutations in Southeast Asia using pyrosequencing. *Prenat Diagn*. 2013;33:1017-1022. [32]

Phylipsen M, Chaibunruang A, Vogelaar IP, Balak JR, Schaap RA, Ariyurek Y et al. Fine-tiling array CGH to improve diagnostics for alpha-and beta-thalassemia rearrangements. *Hum Mutat*. 2012;33:272-280. [38]

Orkin SH, Goff SC, Nathan DG. Heterogeneity of DNA deletion in gamma delta beta-thalassemia. *J Clin Invest*. 1981;67(3):878-884. [41]

Perseu L, Satta S, Moi P, Demartis FR, Manunza L, Sollaino MC et al. KLFI gene mutations cause borderline HBA2. Blood 2011;118:4454-4458. [42]

E. Reference Works, Handbooks and Databases

Bain BJ (2006), Haemoglobinopathy Diagnosis (2nd edition). UK: Wiley-Blackwell. [7]

NHS sickle cell and thalassaemia screening programme (2012) Handbook for antenatal laboratories, 4th edn. NHS sickle cell and thalassaemia screening programme, London. <http://sct.screening.nhs.uk/cms.php?folder=2493>. [10]

Bain BJ, Wild BJ, Stephens AD, Phelan LA. (2010), Variant haemoglobins: a guide to identification (1st edition). UK: Wiley-Blackwell. [13]

Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ. 2009. Disorders of hemoglobin. Genetics, pathophysiology and clinical management. New York: Cambridge university Press. [14]

Patrinos, G.P., B. Giardine, C. Riemer, W. Miller, D.H.K. Chui, N.P. Anagnou, H. Wajcman, and R.C. Hardison Improvements in the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations for population and sequence variation studies 2004 Nucl. Acids Res . 32 Database issue: D537-541. <http://globin.cse.psu.edu/hbvar/menu.html> [25]

Old JM. DNA diagnosis of hemoglobin mutations. Methods in Molecular Medicine 2003;82:111-116. [34]

Banerjee D, Shah SP (2013). Array comparative genomic hybridization. Protocols and applications. Methods in molecular biology (Volume 973). Otowa: Humana Press. [36]

Mulder AB. Moleculaire diagnostiek bij myeloïde maligniteiten. 12^e basiscursus cytologie van bloed en beenmerg. [37]

Valencia CA, Pervaiz MA, Husami A, Oian Y, Zhang K (2013). Next generation sequencing technologies in medical genetics. New York: Springer. [39]

Sanquin bloedvoorziening. Vademecum diagnostisch onderzoek 2014. <https://www.sanquin.org/binaries/content/assets/nl/producten-en-diensten/diagnostische-diensten/diagnostiek/vademecum-2014.pdf> [44]

Hemoglobinopathieën diagnostiek (hematologie en DNA onderzoek). Leids Universitair Medisch Centrum. <https://www.lumc.nl/org/klinische-genetica/patientenzorg/aanvragen-laboratoriumdiagnostiek/specifieke-informatie-uitvoer-diagnostiek/hemoglobinopathieen-diagnostiek/> [47]

T. Wat is de opbrengst van moleculaire diagnostiek bij vermoeden van α -thalassemie op basis van perifeer bloedbeeld en hemoglobine elektroforese?

1.1 Methode

Gedurende de periode van 14-01-2014 tot en met 28-11-2018, werd bij 165 patiënten een MLPA verricht in kader van α -thalassemie. Data werden bekomen door middel van een query in het Laboratorium Werkstation (LWS). CZE en HPLC werden gebruikt voor analyse van het hemoglobinepatroon en kwantificatie van de verschillende componenten. Resultaten van dubbele bepalingen en patiënten met onvolledige gegevens werden geëxcludeerd. Twee patiënten ≤ 2 jaar met een HbS werden ook geëxcludeerd omwille van nog onbetrouwbaar HbA2 percentage in kader van de leeftijd. Hierdoor bekwamen we een groep van 117 patiënten waarvan 18 met HbS.

1.1 Resultaten

1.1.1 Onderverdeling volgens HbA2 (exclusie van HbS)

Negenennegentig patiënten met een gemiddelde leeftijd van 26 jaar (0-78 jaar), werden onderverdeeld volgens de resultaten van het HbA2 bekomen door middel van hemoglobine elektroforese.

Totaal aantal patiënten: 99 (100%)		
α -thalassemie: 47 (47%)		
Normaal HbA2	Gedaald HbA2	Verhoogd HbA2
28 (59,5%)	13 (27,5%)	6 (13%)
Microcytair (MCV < 75-78 fL)		
18 (64%)	11 (85%)	4 (67%)
Ferriprief*		
2 (11%)	1 (9%)	0 (0%)

Tabel 4: Onderverdeling op basis van HbA2. * Ferriprive: ferritine 3-400 $\mu\text{g/L}$ (σ), 13-150 $\mu\text{g/L}$ ($\varnothing$). Indien verhoogd CRP of afwezig ferritine: ijzer 65-175 $\mu\text{g/dL}$ (σ), 50-170 $\mu\text{g/dL}$ ($\varnothing$).

1.2.1.1 Normaal HbA2 (2.2-3.2%)

Zesenvijftig % (55/99) van de patiënten hadden een normaal HbA2 waarvan 28 (51%) gediagnosticeerd werden met α -thalassemie op basis van MLPA. Van deze 28, hadden er 14 (50%) een heterozygote α^+ -thalassemie ($-\alpha^{3,7}$), 4 een α^0 -thalassemie (3 SEA, 1 FIL deletie) en 10 een homozygote α^+ -thalassemie ($-\alpha^{3,7}$).

Bij 64% (18/28) zagen we een microcytair bloedbeeld (7/14 heterozygoot, 7/10 homozygoot en 4/4 α^0 -thalassemie) waarvan 2 ferriprive patiënten (1 homozygote α^+ -thalassemie en 1 α^0 -thalassemie (_FIL)).

Normaal HbA2 (2,2-3,2%): 55/99 (56%)							
Resultaat MLPA	α -thalassemie: 28 (51%)			Negatief: 27 (49%)			
MCV	↓	=	Geen cofo*	↓	=	↑	Geen cofo*
	18 (64%)	6 (22%)	4 (14%)	15 (56%)	8 (30%)	2 (7%)	2 (7%)
Ferriprief	2 (11%)	/	/	6 (40%)	2 (25%)	/	/
Niet ferriprief	11 (61%)	3 (50%)	/	5 (33%)	4 (50%)	1 (50%)	/
Niet gekend	5 (28%)	3 (50%)	4 (100%)	4 (27%)	2 (25%)	1 (50%)	2 (100%)

Tabel 5: MCV en ijzerstatus binnen de patiënten met een normaal HbA2 met en zonder α -thalassemie. *Cofo= complet formule.

1.2.1.2 Verlaagd HbA2 (<2.2%)

Vijfentwintig % (25/99) van de patiënten hadden een verlaagd HbA2 waarvan 13 (52%) gediagnosticeerd werden met α -thalassemie op basis van MLPA. Acht patiënten waren heterozygoot voor α^+ -thalassemie ($-\alpha^{3,7}$), 2 patiënten hadden HbH (SEA en heterozygote $\alpha^{3,7}$ deletie) en 3 waren homozygoot voor α^+ -thalassemie ($-\alpha^{3,7}$ (1); $-\alpha^{3,7}$ en $-\alpha^{4,2}$ (2)).

Verlaagd HbA2 (< 2,2%): 25/99 (25%)							
Resultaat MLPA	α -thalassemie: 13 (52%)			Negatief*: 12 (48%)			
MCV	↓	=	Geen cofo	↓	=	↑	Geen cofo
	11 (85%)	0 (0%)	2 (15%)	7 (58%)	0 (0%)	2 (17%)	3 (25%)
Ferriprief	1 (9%)	/	2 (100%)	4 (57%)	/	/	/
Niet ferriprief	7 (64%)	/	/	/	/	/	/
Niet gekend	3 (27%)	/	/	3 (43%)	/	2 (100%)	3 (100%)

Tabel 6: MCV en ijzerstatus binnen de patiënten met een verlaagd HbA2 met en zonder α -thalassemie. *11 negatieve MLPA's en 1 niet interpreteerbaar.

1.2.1.3 Moleculair onderzoek omwille van verlaagde waarden van een Hb variant en/of onverwacht microcytair bloedbeeld

Bij 19 % (19/99) van de patiënten werd een verhoogd HbA2 gevonden. Een MLPA werd verricht in kader van verlaagde waarden voor een Hb variant, een onverwacht microcytair bloedbeeld en/of verhoogd HbF in combinatie met het gestegen HbA2. Bij 6 patiënten werd een onderliggende α -thalassemie gevonden.

Andere indicaties voor MLPA 19/99 (19%)							
Resultaat MLPA	α -thalassemie: 6 (32%)			Negatief: 13 (68%)			
Onderliggende aandoening	Heterozygote E	Heterozygote C	Geen*	Heterozygote E	β -variant (Hb D)	Geen*	Homozygote E
Aantal	3 (50%)	2 (33%)	1 (17%)	5 (38,5%)	1 (8%)	5(38,5%)	2 (15%)
Bereik waarden onderliggende Hb	15.3-23.3%	26.2-29.1%	/	24.2-25.3%	32.5%	/	87.7-93.3%
MCV ↓	2 (67%)	2 (100%)	0 (0%)	4 (80%)	1 (100%)	5 (100%)	2 (100%)
MCV niet gekend	1 (33%)	/	1 (100%)	Geen anemie: 1 (20%)	/	/	/
Ferriprief	/	/	/	/	/	2	/
Niet ferriprief	2	2	/	3	/	1	1
Niet gekend	1	/	1	2	1	2	1

Tabel 7: Overzicht van patiënten met gestegen HbA2 waarbij een MLPA werd verricht in kader van verlaagde waarden van een Hb variant, onverwacht microcytair bloedbeeld en/of verhoogd HbF. *Bij deze patiënten was er een vermoeden van onderliggende β -thalassemie (gestegen HbA2 en HbF).

1.2.2 HbS positieve patiënten

Elf van de 18 patiënten (61%) met een HbS (7 homozygoot), hadden een onderliggende α -thalassemie. Vier van de patiënten waren heterozygoot voor α^+ -thalassemie ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) en 7 waren homozygoot voor α^+ -thalassemie. Bij patiënten met een HbS in combinatie met een onderliggende α -thalassemie, zagen we statistisch significant hogere HbA2 waarden (mediaan HbA2 = 3.6%) ($p=0.02$) in vergelijking met patiënten zonder onderliggende α -thalassemie (mediaan HbA2 = 2.4%). HbA2 varieerde tussen 2.3-4.3% (2.3-3.8% voor heterozygote en 3.1-4.3% voor homozygote α^+ -thalassemie). Van de patiënten met een heterozygote HbS en α -thalassemie, was het HbS <35% bij 7 patiënten. Deze bevindingen werden ook reeds beschreven in de literatuur.²⁴

2. Welke technieken of combinatie van technieken worden momenteel gebruikt bij moleculaire diagnostiek voor β -thalassemie?

Beta-thalassemieën worden hoofdzakelijk veroorzaakt door puntmutaties (95%) maar deleties zijn ook beschreven.^{1,18} Gekende varianten kunnen worden teruggevonden in de Hbvar database.²⁵ Een onderverdeling kan enerzijds worden gemaakt tussen onderzoeken voor het opsporen van puntmutaties versus deleties en anderzijds tussen onderzoeken voor gekende en ongekende mutaties. In de meeste laboratoria wordt eerst gescreend naar de meest voorkomende varianten door middel van PCR-gebaseerde technieken. Meer dan 90% van de varianten wordt hiermee gevonden. Indien de ongekende varianten niet worden gedetecteerd na verdere screening, dan kan directe DNA sequencing worden verricht voor zeldzame/nieuwe puntmutaties en MLPA voor deleties.¹⁴

2.1 Resultaten enquête

Om na te gaan welke analyses in de praktijk worden gebruikt, stelden we een elektronische enquête op, gericht aan 18 klinische laboratoria (5 in België en 13 in Nederland) waar moleculaire diagnostiek wordt verricht voor α - en/of β -thalassemie. De responsrate op de enquête bedroeg 56%. Voor α -thalassemie wordt voornamelijk gebruik gemaakt van Sanger sequencing, (multiplex) GAP-PCR en MLPA en voor β -thalassemie voornamelijk van Sanger sequencing en in tweede instantie van MLPA. Veel laboratoria besteden hun stalen voor moleculaire diagnostiek voor β -thalassemie nog uit. NGS is in geen van deze centra al in routine gebruik voor diagnostiek van α - en/of β -thalassemie.

	α -thalassemie		β -thalassemie	
	België	Nederland	België	Nederland
(multiplex) GAP-PCR	0	6	0	0
Sanger sequencing	1	4	1*	4
MLPA	2	4	1*	2
NGS	0	0	0	0
Uitbestede analyse	0	0	1	4

Tabel 8: Overzicht resultaten van enquête omtrent moleculaire diagnostiek voor α - en/of β -thalassemie in Belgische en Nederlandse klinische laboratoria. *Cliniques universitaires Saint-Luc UCL Bruxelles, België

2.2 Moleculaire technieken voor diagnostiek van β -thalassemie

2.2.1 Puntmutaties

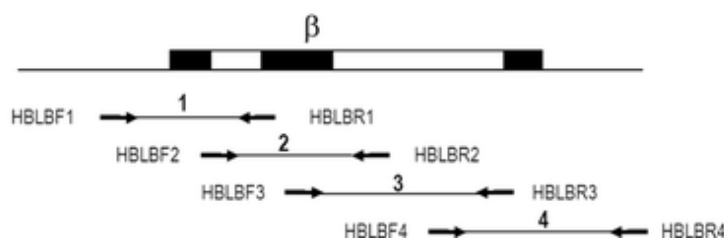
2.2.1.1 Gekende varianten

Voor gekende puntmutaties kan gebruik gemaakt worden van PCR gebaseerde technieken zoals (tetra primer) amplification-refractory mutation system ((ARMS)-PCR) of multiplex-ARMS¹⁴ voor meerdere mutaties, restriction-endonuclease PCR (Re-PCR)^{6,14,26}, real-time PCR (RT-PCR) of ook wel genaamd kwantitatieve PCR (qPCR)^{27,28}, allele-specific oligonucleotide hybridization PCR (ALO-PCR)^{6,14} of reverse dot blot hybridization²⁹ voor meerdere mutaties, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)^{6,14,30}, high-resolution melting analysis (HRMA)^{1,2,31} en pyrosequencing.³² De voor- en nadelen van deze verschillende methodes worden weergegeven in tabel 9.

2.2.1.2 Ongekende varianten

Sanger sequencing

Door middel van Sanger sequencing kan de exacte nucleotiden volgorde van een DNA-fragment of PCR product worden bepaald. De globine genen zijn eerder klein waardoor Sanger sequencing een goede techniek is voor het opsporen van puntmutaties.²



Figuur 2: Schematische voorstelling van de geamplificeerde fragmenten voor directe sequencing van het β -globinegen. Primers worden voorgesteld door middel van horizontale pijlen.²

2.2.2 Deleties

2.2.2.1 Gekende varianten

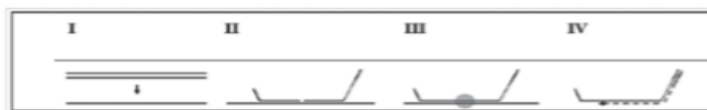
(Multiplex) GAP-PCR

Er wordt gebruik gemaakt van twee primers die complementair zijn aan de aanliggende sequenties van de gezochte deletie(s) op de coderende en niet-coderende streng van het DNA. De primers kunnen geen PCR product genereren, tenzij de deletie de aangrenzende sequenties samenvoegt. Alleen bij aanwezigheid van een deletie zal PCR amplificatie kunnen gebeuren. Het verkregen product wordt onderzocht door middel van elektroforese. Indien verschillende deletie-specifieke primers tegelijk kunnen worden gebruikt, spreken we van multiplex GAP-PCR.^{2,6,33,34}

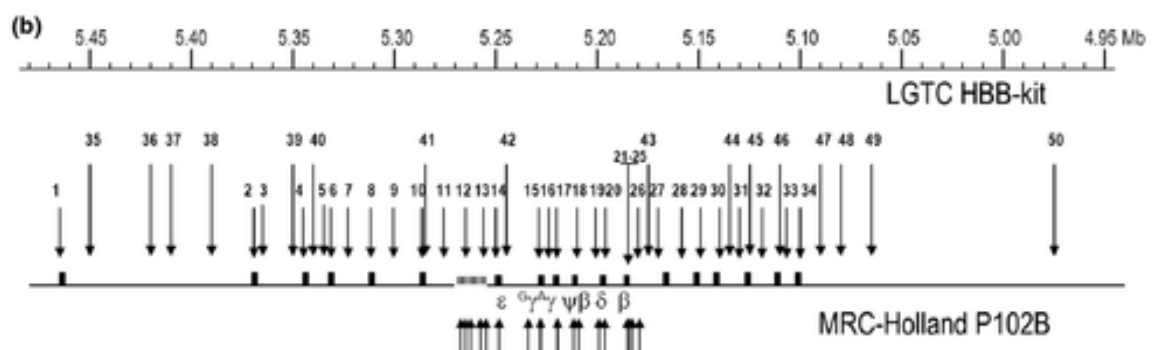
2.2.2.2 Ongekende varianten

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

MLPA is een multiplex PCR methode waarmee gekende en ongekende copy number variaties (CNV) van verschillende DNA en RNA sequenties (tot 50) kunnen worden gedetecteerd en die een onderscheid kan maken tussen sequenties die slechts één nucleotide van mekaar verschillen. Essentieel bij de MLPA-techniek is dat niet het DNA in het staal, maar wel de gehybridiseerde probes aan het DNA geamplificeerd worden.^{2,35}



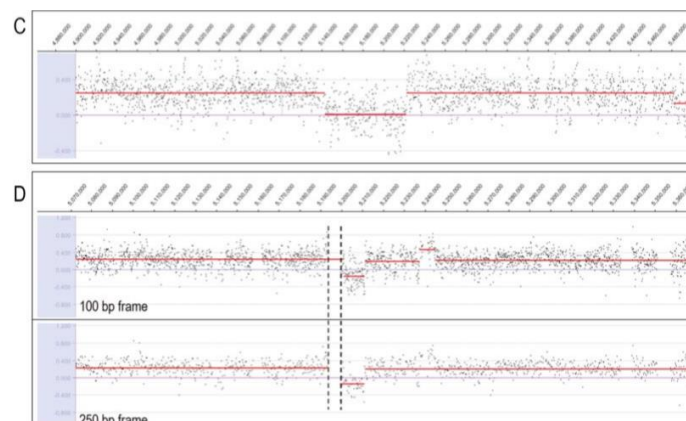
Figuur 3: Schematische voorstelling van de MLPA reactiefasen. I: Denaturatie. II: Hybridisatie van de probes aan complementaire doelwitsequenties. III: Ligatie van de probes. IV: PCR amplificatie van de geligeerde probes.³⁵



Figuur 4: Schematische weergave van de β -globine gen cluster. De verticale pijlen tonen de plaats van de MLPA probes in de commercieel beschikbare kits van LGTC en MRC-Holland. Het grootste verschil tussen de 2 kits zit in de grootte en de plaats van de MLPA probes.²

Array Comparative Genomic Hybridization (Array-CGH)

Verscheidend gelabeld patiënten DNA wordt gehybridiseerd tegen referentie DNA, zodat het mogelijk is om numerieke (chromosomale) afwijkingen (geheel of gedeeltelijk) zichtbaar te maken. Breekpunten kunnen ook worden opgespoord. Fluorescerende signalen worden opgevangen en verwerkt.^{36,37}



Figuur 5: Voorbeeld van array-CGH resultaten. De probe locaties zijn weergegeven boven elke grafiek. De horizontale lijn weerspiegelt het gemiddelde signaalverschil tussen de referentie en de patiënt in blokken van 100 bp ter hoogte van de regio van interesse. C en D hebben deleties in de β -globin gen cluster. C: HPFH-2 deletie; D: Siciliaanse $\delta\beta$ -deletie. Deze afbeelding toont ook het verschil tussen de 100-bp en 250-bp reading frames. De duplicatie is zichtbaar in de 100 bp frame maar niet in de 250 bp frame. Dit toont aan dat er meer ruis is bij hogere resolutie.³⁸

2.2.3 Puntmutaties en deleties

Next generation sequencing (NGS)

Met NGS geautomatiseerde technieken is het sequencen heel erg verbeterd. Tegenwoordig kunnen een groot aantal specifieke mutaties (targeted NGS), alle exomen (whole exome sequencing) en zelfs het hele genoom (whole genome sequencing) met een grote gevoeligheid in één keer geanalyseerd worden.³⁷ NGS wordt in België nog niet routinematig gebruikt voor diagnostiek van β -thalassemie.

2.3 Overzicht van de voor- en nadelen van de belangrijkste technieken voor het opsporen van β -thalassemie

Mutatie	Methode	Voordelen	Nadelen
Puntmutaties Gekende varianten	ARMS-PCR	-Eenvoudig, snel, goedkoop -Multiplex variant screening mogelijk -Alle gekende puntmutaties -Van zeldzame of nieuwe mutaties opgespoord met DNA sequencing, kunnen ARMS primers worden gemaakt voor snellere en goedkopere detectie	-Streng PCR-voorwaarden zijn van cruciaal belang voor nauwkeurigheid. -Als primers afbreken op het allel-specifiek 3' uiteinde, dan is de PCR reactie niet specifiek
	Re-PCR	-Eenvoudig, snel, goedkoop -Betrouwbaar	-Niet mogelijk voor alle mutaties: weinig β-thalassemie mutaties creëren of verwijderen een restrictieve endonuclease plaats en genereren diagnostische producten -Onvolledige of gedeeltelijke digestie => vals positieve/negatieve resultaten => noodzaak tot gebruik van controles -Sommige enzymen zijn duur
	RT-PCR	-Heel snel, betrouwbaar, goedkoop -Ook (on)gekende deleties -Kwantitatief en kwalitatief -Geen post PCR analyse: gelelektroforese niet nodig want de vorming van de PCR producten wordt direct gemeten -Reactie mix moet na PCR niet meer worden geopend, wat het risico op contaminatie vermindert	-Dure toestellen -Hoge kostprijs voor screening naar meerdere varianten maar effectief voor bijvoorbeeld prenatale diagnose met gekende mutaties van de ouders
	ALO-PCR	Goede techniek voor veel voorkomende mutaties of een klein aantal zeldzamere mutaties	Geen goede techniek voor het opsporen van een groot aantal verschillende mutaties: bij elke mutatie moet een aparte hybridisatie en wasstap worden verricht
	Reverse dot blot hybridization	-Eenvoudig, snel, goedkoop en betrouwbaar -Multiplex variant screening (voorkeur voor frequente mutaties anders duur en tijdrovend)	-Beperkt aantal commerciële kits beschikbaar (niet aangeraden te gebruiken als er geen alternatieve diagnostische methoden in het laboratorium beschikbaar zijn) -Moeilijk te standaardiseren en intern te valideren
	DGGE	-Middelgrote screening -Relatief goedkoop -Robuuste heteroduplex detectie -Gekende en ongekende puntmutaties	-Definitieve identificatie met een andere methode -Sommige regio's (zeker G-C rijke) kunnen moeilijk geanalyseerd worden -Soms verschillende DGGE patronen bij eenzelfde mutatie: interpretatie kan moeilijk zijn, ervaring vereist -Technisch veeleisend

	HRMA	-Eenvoudige techniek indien eenmaal gestandaardiseerd -Snel, automatisatie mogelijk -Geen post-PCR analyse	-Technisch veeleisend met streng testontwerp -Definitieve identificatie met een andere methode -Dure toestellen
	Pyrosequencing	-Semi-kwantitatief -Sneller en hogere sensitiviteit dan Sanger sequencing -Kosten-effectief	-DNA sequentie van slechts 20-50 nucleotiden -Elke variatie in de doelwitsequentie moet gekend zijn
Puntmutaties Ongekende varianten	Sanger sequencing	-Generieke methode om kleine puntmutaties op te sporen	-Dure toestellen -Heel arbeidsintensief voor beperkte hoeveelheid genen die per meting kunnen worden geanalyseerd
Deleties Gekende varianten	GAP-PCR	-Eenvoudig, snel, goedkoop -Multiplex mogelijk	-Alleen voor deleties met gekende breekpuntsequenties -Amplificatie van GC-rijke domeinen zijn technisch moeilijk -Gevoelig voor alle drop-out (niet aanbevolen als enige methode voor prenatale diagnose)
Deleties Ongekende varianten	MLPA	-Indien primer-probe sets gevalideerd zijn, is de methode eenvoudig, snel en automatiseerbaar -Commerciële kits beschikbaar	-Automatische sequencer voor fragmentanalyse is duur -Ongekende/ sporadische SNP's kunnen interfereren met primer-probe hybridisatie -DNA kwaliteit en concentratie zijn kritiek
	Array-CGH	-Hoge resolutie -Eenvoudig -Hoge reproduceerbaarheid -Aantonen van breekpunten om zo eventueel primers te ontwerpen voor GAP-PCR (bijvoorbeeld nuttig als geen MLPA beschikbaar) -Detectie van CNV's	-Toestellen en assays zijn duur -Geen precieze karakterisatie van de deleties/inserties
Puntmutaties/deleties	NGS	-Geautomatiseerd -Alle varianten (puntmutaties, deleties, inserties,...) -Specifieke mutaties (Targeted NGS) -Exoom (WES) -Hele genoom (WGS)	-Kostprijs -Arbeidsintensief

Tabel 9: Voor- en nadelen van moleculaire technieken voor het opsporen van β -thalassemieën.^{1,2,6,14,26-39}

ARMS-PCR = amplification-refractory mutation system, Re-PCR = restriction-endonuclease PCR, RT-PCR = real-time, ALO-PCR = allele-specific oligonucleotide hybridization PCR, DGGE = denaturing gradient gel electrophoresis, HRMA = high-resolution melting analysis (HRMA), MLPA = Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, array-CGH = Array Comparative Genomic Hybridization, NGS = next generation sequencing.

3. In welke gevallen wordt er moleculaire diagnostiek uitgevoerd voor β -thalassemie?

In de literatuur wordt geen eenduidige indicatie gegeven wanneer moleculaire diagnostiek voor β -thalassemie moet worden verricht. De indicaties kunnen worden onderverdeeld in drie groepen die hieronder verder worden toegelicht.

3.1 Prenatale diagnose

De NHS en ENERCA hebben richtlijnen opgesteld voor antenatale en neonatale screening. Eerste en tweedelijns onderzoeken kunnen een vermoedelijke diagnose geven, maar door DNA onderzoek kan de definitieve diagnose worden verkregen.^{1,10,40} Bij de interpretatie van de resultaten moeten de hematologische, biochemische, moleculaire resultaten en de familiale anamnese steeds samen in rekening worden gehouden.^{3,10} De kennis van het juiste genotype is belangrijk om correcte genetische counseling te kunnen verrichten en prenatale diagnostiek.^{1-3,5,17,18}

3.2 Onduidelijke diagnose met eerstelijns onderzoeken (biochemisch en hematologisch).

Met eerste- en tweedelijns onderzoeken, zullen de meeste β -thalassemieën kunnen worden gediagnosticeerd. In de meeste artikels stelt men een diagnose voor heterozygote β -thalassemie als MCH <27pg, MCV <79fl en HbA2 >3,2% bedraagt. Deze waarden kunnen worden beïnvloed door meerdere factoren waardoor interpretatie op basis van de biochemische en hematologische waarden niet altijd mogelijk is en moleculaire diagnostiek vereist is. Een oplijsting van de meest voorkomende beïnvloedende factoren wordt hieronder weergegeven.

3.2.1 Deleties in LCR van de HBB locus

Een minderheid van de β -thalassemieën wordt veroorzaakt door deleties. Deleties kunnen de HBB en HBD genen omvatten. Soms zijn er ook zeldzame mutaties in de regulatorische regio van de HBB locus (LCR) wat resulteert in een 'non-expressie' van de verbonden β -achtige globine genen. (De β -achtige globine genen vertegenwoordigen een cluster van ongeveer 40kb met deze volgorde: 5'- ϵ - γ - δ - β -3'. ϵ staat voor het embryonale β -achtige globine gen, γ en δ voor de niet-allelische foetale β -achtige globine genen, δ voor het kleine volwassen δ -achtige gen en β voor het grote volwassen β -globine gen.)⁴¹ We zien dan ook geen stijging in HbA2 wat de diagnose van β -thalassemie biochemisch en hematologisch moeilijk maakt. Meestal zien we wel een stijging in HbF, maar indien dit niet het geval is dan is de differentiaal diagnose van α - en β -thalassemie moeilijk en zijn moleculaire onderzoeken geïndiceerd.¹⁸

3.2.2 'Silent' of 'near silent' β -thalassemie dragers met borderline HbA2 en KLF1 variant

Sommige β -thalassemie drager genotypes zijn geassocieerd met borderline HbA2 levels.^{1,10,17} Bij afkapwaarden van HbA2 van 3.2% met een MCH van 27 pg zullen sommige casussen van β -thalassemie worden gemist. Voorbeelden van genetische variaties die geassocieerd zijn met normale/borderline HbA2 waarden zijn c.-50A>C, c.92+6T>C, c.-151C>T, c.111A>G, c.110T>C, etc.^{1,10} Mutaties in het KLF1 gen zorgen voor activatie van het HbD gen met als gevolg een stijging van het HbA2 (3,2%±0,2%). MCV en MCH zijn meestal binnen de normale grenzen. De meest frequente KLF1 mutatie is p.Ser270X.⁴²

Variatie HGVS nomenclatuur	Variatie traditionele nomenclatuur	Hb (g/dl)	MCV (fL)
c.-151C>T	β -101 (C T)	13,5	88.5 ± 78
c.-142C>T	β -92 (C(T)	11,9 - 15,7	83.0 ± 6.0
c.-18C>G	β +33 (C(G)	10,6	82.0 ± 9.2
c.316-7C>G	β IVS2-844 (C G)	8,2	96.0 ± 4.0
c.-50A>C	Cap+1 (A(C)	-	23 - 26
c.92+6T>C	β IVS1-6 (T C)	9,55 - 14,35	71.0 ± 4.0
c.111A>G	-	10,7 - 14,3	71 - 78
c.110T>C	-	8,9 - 15	65 - 74
c.6C>G	β +1480 (C G)	14.3 - 14.9	88.3 ± 9.5
	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	-	85.5 ± 7.8
	KLF1 varianten (29)	-	82.7 ± 5.7

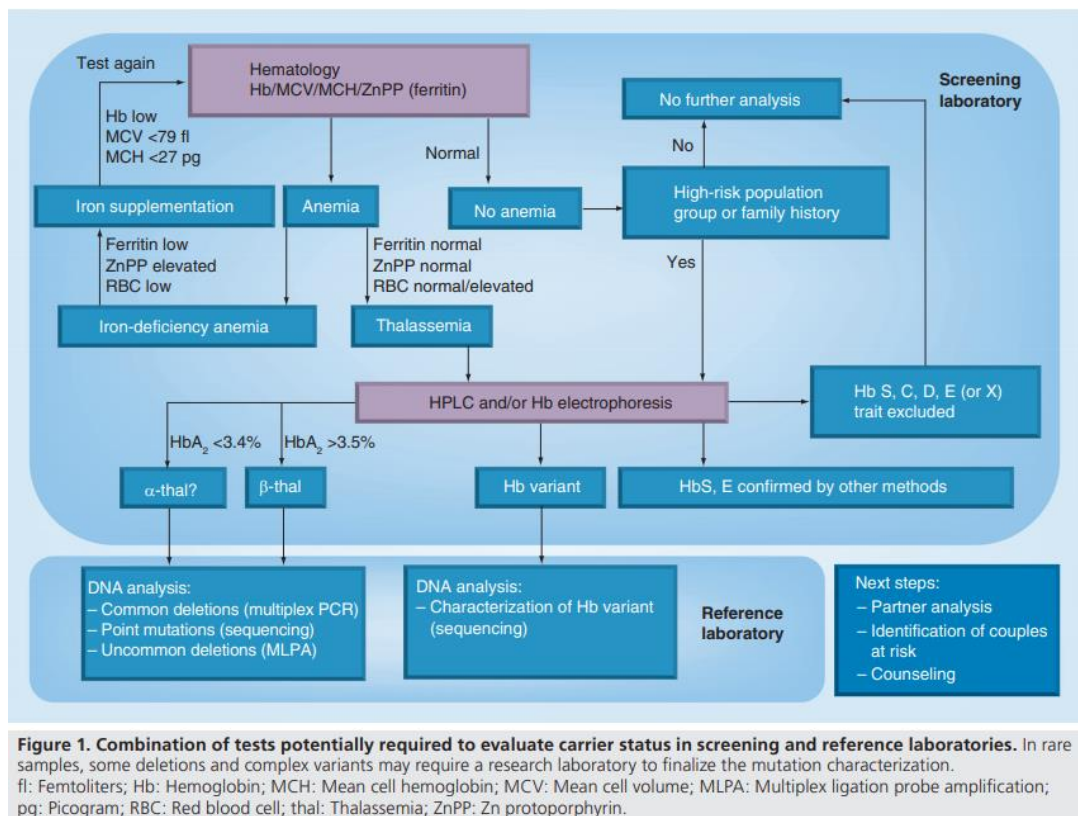
Tabel 10: Genetische variaties geassocieerd met normale/borderline HbA2 waarden.^{1,25}

Tabel 11 toont een oplijsting van situaties waarin de hematologische parameters niet overeenkomen met een typische diagnose van β -thalassemie en hoe je deze waarden dient te interpreteren. Bij het vinden van deze niet consistente hematologische waarden is moleculaire diagnostiek vereist.^{1,3,5,6,10,13,15,33,43,44}

Hematologische parameters	Mogelijke interpretatie
MCV < 79 fL, MCH < 27pg, normale Hb elektroforese/HPLC/CE, normaal % HbA2 en HbF	Ijzerdeficiëntie Heterozygote α -thalassemie Heterozygositeit voor milde β -thalassemie varianten (soms is HbA2 borderline verhoogd) Heterozygote δ -met β -thalassemie Heterozygote $\epsilon\gamma\delta\beta$ -thalassemie
Normale/borderline verlaagde RBC parameters met gestegen HbA2	Interactie van α - en β -thalassemie β -thalassemie dragers met foliumzuur of B12 deficiëntie of hepatitis
Normale of verlaagde RBC parameters met gestegen HbF (>5%) en normaal of laag HbA2	Heterozygote $\delta\beta$ -thalassemie, $\Lambda\gamma\delta\beta$ -thalassemie of HPFH
Normale RBC parameters met normaal/borderline HbA2	Triplicatie van α -genen, KLF1 varianten, milde β -thalassemie variant
Ernstig verlaagde RBC parameters en gestegen HbA2	Multipale α -globine genen (>4) en heterozygote β -thalassemie

Tabel 11: Mogelijke interpretaties van hematologiewaarden die niet consistent zijn met typische β -thalassemie trait.¹

Verschillende flowcharts zijn beschikbaar voor het interpreteren van de hematologische waarden en de indicaties voor het uitvoeren van moleculaire diagnostiek.^{3,6,10,15,33,43,45,46}



Figuur 6: Voorbeeld van een flowchart voor het interpreteren van de hematologische waarden en de indicaties voor het uitvoeren van moleculaire diagnostiek.³

3.3 Definitieve diagnose bij mogelijke dragers en bij patiënten met gestegen HbA2

Hematologische en biochemische onderzoeken zijn de eerstelijns onderzoeken voor de diagnose van Hbp. Indien de resultaten voldoen aan de criteria voor heterozygote β -thalassemie (MCV < 79 fl, MCH < 27 pg, HbA2 > 3,2%) dan is de diagnose redelijk betrouwbaar en dient geen verdere diagnostiek te worden verricht, tenzij voor het bepalen van de onderliggende genetische mutaties voor prenatale diagnostiek.³³ Er zijn echter heel veel gevallen waar de biochemische en hematologische resultaten moeilijker te interpreteren zijn door interfererende factoren. Hier is moleculaire diagnostiek wel vereist (zie 3.2). In de literatuur stellen enkelen ook de indicatie om moleculaire diagnostiek te verrichten bij een verhoogd HbA2.^{2,47} Dit voor het bevestigen van de juiste diagnose en het kennen van de onderliggende genetische variatie, maar ook om zo de ernst van het klinisch fenotype te achterhalen bij bijvoorbeeld homozygote β -thalassemie.^{15,33,43} In een artikel van Old en Brancaoleoni et al., is moleculaire diagnostiek geen indicatie om dragerschap te achterhalen, maar wel om de ernst van het fenotype te identificeren (transfusie versus niet-transfusiedependent), want ook het samen overerven van verschillende globinedefecten kan verschillende fenotypes tot uiting brengen.¹⁵

Besluit

- ❖ Een retrospectieve analyse van patiënten bij wie tussen 2014 en 2018 een MLPA voor α -thalassemie werd uitgevoerd in UZ Leuven, werd verricht. Vijftig procent (58/117) van al onze patiënten werden gediagnosticeerd met een α -thalassemie op basis van MLPA. Alpha-thalassemie werd vastgesteld bij 25% (25/99) van de patiënten met een verlaagd HbA2 en bij 56% (55/99) met een normaal HbA2. Indien het HbA2 normaal was, zagen we een hoger percentage ferriprivie bij een microcytair bloedbeeld en een negatieve MLPA, in tegenstelling tot wanneer de MLPA positief was. Bij de patiënten met een verlaagd HbA2 moeten we voorzichtig zijn met deze conclusie, gezien de ijzerstatus veelal niet gekend was. Indien een onderliggende hemoglobine variant aanwezig is, kan HbA2 niet betrouwbaar worden geïnterpreteerd. Patiënten met een HbS in combinatie met een onderliggende α -thalassemie, hebben statistisch significant hogere HbA2 waarden ($p=0.02$) in vergelijking met patiënten zonder onderliggende α -thalassemie.
- ❖ Voor de moleculaire diagnostiek van β -thalassemie wordt in de meeste laboratoria eerst gescreend naar de meest voorkomende varianten door middel van PCR-gebaseerde technieken ($>90\%$ van de varianten). Indien de ongekende varianten niet worden gedetecteerd na verdere screening, dan kan directe DNA sequencing worden verricht voor zeldzame/nieuwe puntmutaties en MLPA voor deleties. Uit een elektronische bevraging gericht aan 18 klinische laboratoria in België en Nederland waar moleculaire diagnostiek wordt verricht voor α - en/of β -thalassemie, zagen we dat Sanger sequencing, (multiplex) GAP-PCR en MLPA voornamelijk worden gebruikt voor α -thalassemie. Voor β -thalassemie is dit hoofdzakelijk Sanger sequencing en in tweede instantie MLPA.
- ❖ De belangrijkste indicaties voor moleculaire diagnostiek naar β -thalassemie zijn prenatale diagnostiek, onduidelijke diagnose met eerstelijns onderzoeken en definitieve diagnose bij mogelijke dragers en patiënten met gestegen HbA2.

COMMENTS

/

TO DO/ACTIONS

- 1) Bezoek aan het LUMC in Leiden voor exploratie van de aldaar verrichte moleculair diagnostische onderzoeken voor β -thalassemie.
- 2) Overleg met het centrum menselijk erfelijkheid van UZ Leuven om diagnostiek voor β -thalassemie zelf op te starten.
- 3) Validatie en opstart van moleculair onderzoek voor β -thalassemie in UZ Leuven.

ATTACHMENTS

/