

Diagnostický postup pri podozrení na hemoglobínopatiu

Doc.MUDr. Viera Fábryová, CSc.

Guidelines upravené podľa odporúčania **WHO**, **ENERCA** (European Network for Rare and Congenital Anaemias) a **TIF** (Thalassaemia International Federation)

Odporúčania pre:

1. Krajiny so sporadickým výskytom hemoglobínopatií
2. Krajiny s vysokým výskytom hemoglobínopatií

Diagnostika hemoglobínopatie v našich podmienkach so sporadickým výskytom choroby sa vykonáva pri klinickom a/alebo laboratórnom podozrení na hemoglobínopatiu.

Z diagnostických metód sa okrem základného vyšetrenia KO (krvný obraz), KN (krvný náter), vyšetrenia parametrov železa a vitamínov ako špeciálne testy najčastejšie využívajú rôzne druhy ELFO (elektroforézy) hemoglobínu, HPLC (vysokoučinná kvapalinová chromatografia), izoelektrická fokusácia. Konečnú diagnózu však poskytuje až vyšetrenie DNA alebo analýza globínových reťazcov. Na orientačné vyšetrenie je možné použiť niektoré orientačné kvalitatívne testy.

Klinické podozrenie na možnú hemoglobínopatiu:

- I. Klinická suspekcia na kosáčikovú anémiu (resp. heterozygotitu HbS)
- II. Klinická suspekcia na talasémiu alfa, beta, hemoglobín H, hemoglobín Bart's hydrops fetalis
- III. Nevysvetliteľná mikrocytóza
- IV. Nevysvetliteľná hemolýza
- V. Nevysvetliteľná cyanóza
- VI. Nevysvetliteľná sekundárna erytrocytóza
- VII. Pri vyšetovaní HbA1c sa na HPLC zistí možný variant hemoglobínu.

I. Diagnostický postup pri podozrení na kosáčikovú anémiu

Kosáčikovanie erytrocytov vzniká nielen pri kosáčikovej anémii v *homozygotnom* stave, ale aj pri niektorých ďalších hemoglobínopatiách (kosáčikové choroby).

Postup vyšetrenia u pacientov so suspektnou kosáčikovou anémiou

1) homozygot pre hemoglobín S HbSS

- a) RA (rodinná anamnéza), etnický pôvod rodiny (Afrika, ale aj Grécko, Taliansko, India).
- b) klinické vyšetrenie: daktylitída, splenická sekvestrácia, aplastické krízy vyvolané infekciou parvovírusom B19, bolestivé krízy.
- c) KO, KN, test solubility hemoglobínu, orientačný test na sklíčku po deoxygénácii,
- d) ELFO hemoglobínu na celulózoacetátových fóliách pri alkalickom pH, kapilárna elektroforéza, HPLC. Testy u detí mladších ako 6 mesiacov nie sú spoľahlivé (vysoký obsah hemoglobínu F).
- e) DNA analýza

2) heterozygot pre hemoglobín S (HbS)

- a) nebývajú klinické poruchy, avšak pri niektorých záťažových situáciách (infekcia, hypoxia, extrémna námaha, horolezectvo, gravidita) sa môže objaviť nejasná hematúria, v krvnom nátere mikrocyty s predĺženou osou až kosáčikové formy.
- b) V ELFO hemoglobínu môže byť zvýšená hodnota hemoglobínu A2.

- c) Deficit železa ako aj megaloblastové zmeny môžu prekryvať uvedený obraz. Najmä u pacientov z vyššie uvedených etník je potrebná zvýšená pozornosť.

Poznámka: Pred anestetickým a chirurgickým výkonom je u pacienta s podozrením na nosičstvo génu hemoglobínu S potrebné vykonať uvedené testy a upozorniť anesteziológa a chirurga na mimoriadnu prevenciu hypoxie, možného zníženia objemu krvi, acidózu a hypotermiu.

II. Diagnostický postup pri podozrení na talasémiu

Beta talasémia

- 1) **Na beta-talasémia major** je treba myslieť, keď dieťa po 3-6 mesiacoch veku (najčastejšie určitého etnického pôvodu) má mikrocytovú anémiu, ktorá nie je zapríčinená deficitom železa.

Postup vyšetrenia:

- rodinná anamnéza, etnický pôvod, vhodné vyšetrenie oboch rodičov s konzultáciou
 - klinický obraz – porucha vývoja, rôzne somatické a orgánové zmeny
 - KO, KN, bazofilné bodkovanie erytrocytov (inklúzie alfa reťazcov)
 - v kostnej dreni je erytroidná hyperplázia, dyserythropoéza, bazofilné bodkovanie
 - ELFO hemoglobínu a HPLC sú vysoké hodnoty hemoglobínu A2 a F, hemoglobín A je neprítomný alebo značne znížený
 - DNA analýza
- 2) **Na beta-talasémia intermédiá** je treba myslieť, keď staršie dieťa alebo adolescent (najčastejšie určitého etnického pôvodu) má mikrocytovú anémiu, hepatosplenomegáliu, niekedy žltáčku, prominujúce nadočnicové oblúky a líčne kosti, poruchy vo vývoji zubov. Väčšinou obaja rodičia sú heterozygoti pre beta-talasémiu, niekedy jeden z nich môže mať „tichú“ mutáciu. Dieťa je dvojitý heterozygot.

Postup vyšetrenia

- ako pri talasémia major
 - v ELFO hemoglobínu a v HPLC je prítomný hemoglobín A2 a F, nízke percento hemoglobínu A.
- 3) **Beta-talasémia minor** – je potrebné vylúčiť najprv deficit železa a anémiu pri ACD.

Postup vyšetrenia:

- rodinná anamnéza, etnický pôvod
- v objektívnom vyšetrení niekedy splenomegália
- KO v norme, resp. anémia, znížené hodnoty MCV, v krvnom nátere mikrocyty, anizocyty, poikilocyty, bazofilné bodkovanie, terčové bunky, retikulocytóza, zvýšená osmotická rezistencia erytrocytov,
- ELFO hemoglobínu a HPLC - zvýšené hodnoty HbA2 (v 1/3 prípadov aj HbF)
- DNA analýza

*Poznámka: Problémom môže byť **talasémia minima** bez akýchkoľvek laboratórnych zmien (môže sa prejaviť v homozygotnom alebo dvojitom heterozygotnom stave potomstva dvoch heterozygotných rodičov).*

Alfa talasémia

- 1) **Alfa+ talasémia v heterozygotnej (-, alfa / alfa, alfa) a homozygotnej (-, alfa / -, alfa) forme.** Je potrebné vylúčiť najprv beta-talasémiu a deficit železa.

Postup vyšetrenia:

- RA, etnický pôvod
- klinický obraz je nenápadný

- c) anémia nemusí byť prítomná, sú znížené hodnoty MCV a MCH
- d) ELFO hemoglobínu a HPLC sú v norme (zriedka sa zachytí hemoglobín Bart)
- e) DNA analýza

Poznámka: Na rozdiel od beta-talasémie môže byť hneď po narodení nápadná mikrocytóza.

2) Alfa⁰ talasémia v heterozygotnej forme (-, - / alfa, alfa)

Postup vyšetrenia:

- a) RA, etnický pôvod
- b) klinický obraz je nenápadný.
- c) môže byť ľahká anémia, zvýšený počet erytrocytov, retikulocytóza, znížené hodnoty MCV, občas sa dajú dokázať inklúzie hemoglobínu H.
- d) ELFO hemoglobínu a HPLC sú v norme
- e) DNA analýza.

Poznámka: Po narodení je v krvnom nátere nápadná mikrocytóza, prechodne sa v ELFO alebo HPLC môže zachytiť hemoglobín Bart.

3) Hemoglobín Constant Spring

Postup vyšetrenia:

- a) Má nápadnejší klinický obraz, môže byť anémia, žltáčka, splenomegália.
- b) Laboratórne znížené MCV, MCH, zvýšený MCHC, bazofilné bodkovanie erytrocytov, retikulocytóza.
- c) Je možné ho dokázať na ELFO hemoglobínu na acetátocelulóзовých fóliách pri alkalickom pH a pomocou HPLC
- d) DNA analýza.

4) Hemoglobín H (alfa talasémia -,-, /-, alfa), vytvára sa hemoglobín zo 4 beta reťazcov.

Postup vyšetrenia:

- a) RA, etnický pôvod
- b) splenomegália
- c) anémia, znížené hodnoty MCV, retikulocytóza, inklúzie hemoglobínu H („golfové loptičky“),
- d) ELFO hemoglobínu - prítomný hemoglobín H, nízke hodnoty hemoglobínu A2.
- e) HPLC
- f) DNA analýza

5) Hemoglobín Bart's Hydrops Fetalis (alfa talasémia -,- /-,-)

Dieťa sa narodí mŕtve alebo skoro umiera (najčastejší etnický pôvod je Čína, juhovýchodná Ázia, Turecko, oblasť Stredozemného mora).

III. Diagnostický postup pri nevysvetliteľnej mikrocytóze

Potrebné vylúčiť deficit železa a anémiu chronických chorôb. Anémia nemusí byť prítomná.

Postup vyšetrenia:

- a) rodinná anamnéza, etnický pôvod
- b) klinický obraz väčšinou nenápadný
- c) KO, krvný náter- hodnoty MCV sú znížené; ak je MCH menej ako 27 pg treba myslieť na heterozygotnú beta- talasémiu. Pri hodnote MCH menej ako 25 pg sa môže jednať o alfa-talasémiu.
- d) ELFO hemoglobínu. Ak sa pri vyšetrení ELFO hemoglobínu nezistí zvýšená hodnota HbA₂, zvážiť inú hemoglobinopatiu.
- e) HPLC
- f) DNA analýza

IV. Diagnostický postup pri nevysvetliteľnej hemolytickej anémii

Potrebné vylúčiť častejšie príčiny hemolýzy.

Postup vyšetrenia možnej hemoglobinopatie:

1) Hemoglobín H

- a) RA, etnický pôvod
- b) klinický nález – splenomegália, žltáčka, tmavý moč, žlčové kamene
- c) znížené hodnoty MCV, MCH, MCHC, mikrocytóza, hypochrómia, poikilocytóza, terčové bunky, inklúzie hemoglobínu H,
- d) ELFO hemoglobínu
- e) HPLC
- f) DNA analýza.

2) Hemoglobín C

- a) RA, etnický pôvod
- b) klinický nález – splenomegália, žltáčka, tmavý moč, žlčové kamene
- c) znížené hodnoty MCV a MCH, terčové bunky, rôzne deformované erytrocyty, hypochrómia, kryštály hemoglobínu C v erytrocytoch,
- d) ELFO hemoglobínu
- e) HPLC
- f) DNA analýza.

3) Nestabilné hemoglobíny

- a) V bode a, b, vid' vyššie. Ikterus sa objavuje len občas, väčšinou pri infekcii alebo po užití oxidujúcich látok.
- c) KO, KN, zvýšené hodnoty MCV, znížené MCHC, polychromázia, rôzne deformácie erytrocytov, Heinzove telieska, inklúzie hemoglobínu H, tepelný alebo isopropanolový test na nestabilné hemoglobíny,
- d) ELFO hemoglobínu
- e) HPLC
- f) DNA analýza.

V. Diagnostický postup pri nevysvetliteľnej cyanóze

v prípade normálnej kyslíkovej saturácie v arteriálnej krvi:

- vylúčenie enzýmovej poruchy (deficit cytochróm b5-Met-Hb-NADH reduktázy, výskyt môže byť aj u súrodencov pacienta)
- methemoglobín pri možnom hemoglobíne M so sklonom k oxidácii (výskyt je v rodine vo vertikálnej línii).
- variantné hemoglobíny so zníženou afinitou ku O₂ a nestabilné hemoglobíny

Postup vyšetrenia:

- a) RA
- b) klinický nález cyanózy
- c) KO, KN (Heinzove telieska), tepelný alebo isopropanolový test na nestabilné hemoglobíny,
- d) vyšetrenie spektrálnej absorpcie hemolyzátu
- e) ELFO hemoglobínu (pred elektroforézou všetky vyšetřované hemoglobíny majú byť zmenené na methemoglobín pridaním KCN).

VI. Diagnostický postup pri nevysvetliteľnej erytrocytóze

Vylúčenie primárnej polycytémie a ostatných príčin sekundárnej erytrocytózy. Možná je sekundárna erytrocytóza vyvolaná hemoglobínmi s vysokou afinitou ku kyslíku (včítane niektorých hemoglobínov M).

Postup vyšetrenia:

- a) RA (autozomálne dominantná dedičnosť), etnický pôvod
- b) klinický nález pletory
- c) KO (zvýšené hodnoty hemoglobínu, erytrocytov, hematokritu), KN, tepelný alebo isopropanolový test na nestabilné hemoglobíny,
- d) ELFO hemoglobínu (pri alkalickom aj kyslom pH),
- e) HPLC
- f) izoelektrická fokusácia
- g) erytropoetín

Problémy pri diagnostike hemoglobinopatií:

- **Organizačné**
 - nemyslí sa na možnú hemoglobinopatiu
 - nevykoná sa príslušný test, aj keď sa naň myslí (podcenenie diagnostiky, finančné problémy)
 - laboratórium vykonávajúce príslušné testy nemá dost' informácií na stanovenie správnej diagnózy (nie je uvedený etnický pôvod pacienta, transfúzna liečba, podávanie liekov)
- **Technické**
 - bežné laboratórne chyby rôzneho druhu, neskúsenosť personálu v uvedenej diagnostike
 - potrebné zvolenie správneho diagnostického postupu, overenie výsledku viacerými metódami
 - v krajinách len so sporadickým výskytom beta-talasémií sa beta-talasemická črta hodnotí mylne ako hepatopatia, deficit železa a vitamínov, účinok niektorých liekov a pod.
 - pri vyšetovaní KO skladovaných vzoriek sa MCV erytrocytov po 24 hodinách od odberu krvi zvyšuje
 - diagnostika beta-talasémie sa má vykonať aj pri hraničných hodnotách HbA2 3,5% a MCH menej ako 27 pg. Tiché formy beta-talasémie pri normálnych hodnotách parametrov krvného obrazu a bežnej diagnostike unikajú zachyteniu.
 - podcenený význam rodinnej anamnézy
 - po preliečení deficitu železa je potrebná kontrola krvného obrazu; dôležité myslieť aj na to, že deficit železa znižuje frakciu HbA2 pri ELFO hemoglobínu
 - zvýšený HbA2 môže mať aj iné príčiny ako je napr. HIV infekcia alebo nestabilné hemoglobíny.

Poznámka: Podrobný postup jednotlivých testov vid' v príslušnej literatúre

Centrá pre vyšetrenie hemoglobínopatií

V prípade objavenia sa pacienta so suspektnou hemoglobínopatiou môžete po dohovore poslať na doriešenie jeho krvné vzorky (1x skúmavka s krvou ako na KO odobratá do EDTA a 1x krvný náter nativný nezafarbený) na jedno z uvedených pracovísk:

Ing. Jana Netriová, MUDr. Peter Božek, CSc., OKBH, Nemocnica sv. Michala (NMO), Cesta na Červený most 1, 83331 **Bratislava**

MUDr. Monika Drakulová, Synlab SK s.r.o., Limbová 5, 833 05 **Bratislava**

MUDr. Zuzana Lalahová-Striežencová, MPH, Ing. M. Oslancová, OKBH, DFNSP, 833 40 **Bratislava**

RNDr. Michaela Macichová, OKBH, FN L. Pasteura, Trieda SNP 1, 040 01 **Košice**

RNDr. Andrea Kollárová, VLM- lab. lekárskej genetiky FN Nitra, Špitálska 6, 95001, **Nitra**

Register hemoglobínopatií na Slovensku

Register pre hemoglobínopatie bol vytvorený za účelom epidemiologického výskumu talasémii a iných hemoglobínopatií na Slovensku. Centrum poskytuje informácie a konzultácie u pacientov so suspektnými alebo diagnostikovanými hemoglobínopatiami.

Adresa:

Doc. MUDr. Viera Fábryová, CSc.

Nemocnica sv. Michala (NMO), hematológia

Cesta na Červený most 1, 83331 Bratislava

E-mail: viera.fabryova@nsmas.sk

Tel.č.: 02-59351-372.

V prípade novo zachytenej hemoglobínopatie prosíme hlásiť na uvedenú adresu.

Informácia má obsahovať:

Meno a priezvisko pacienta, rodné číslo alebo dátum narodenia, etnická príslušnosť, rodinná anamnéza, klinický nález (základné údaje), výsledky KO a ELFO hemoglobínu, príp. ostatné potrebné laboratórne vyšetrenia.