

Gruppens medlemmer:

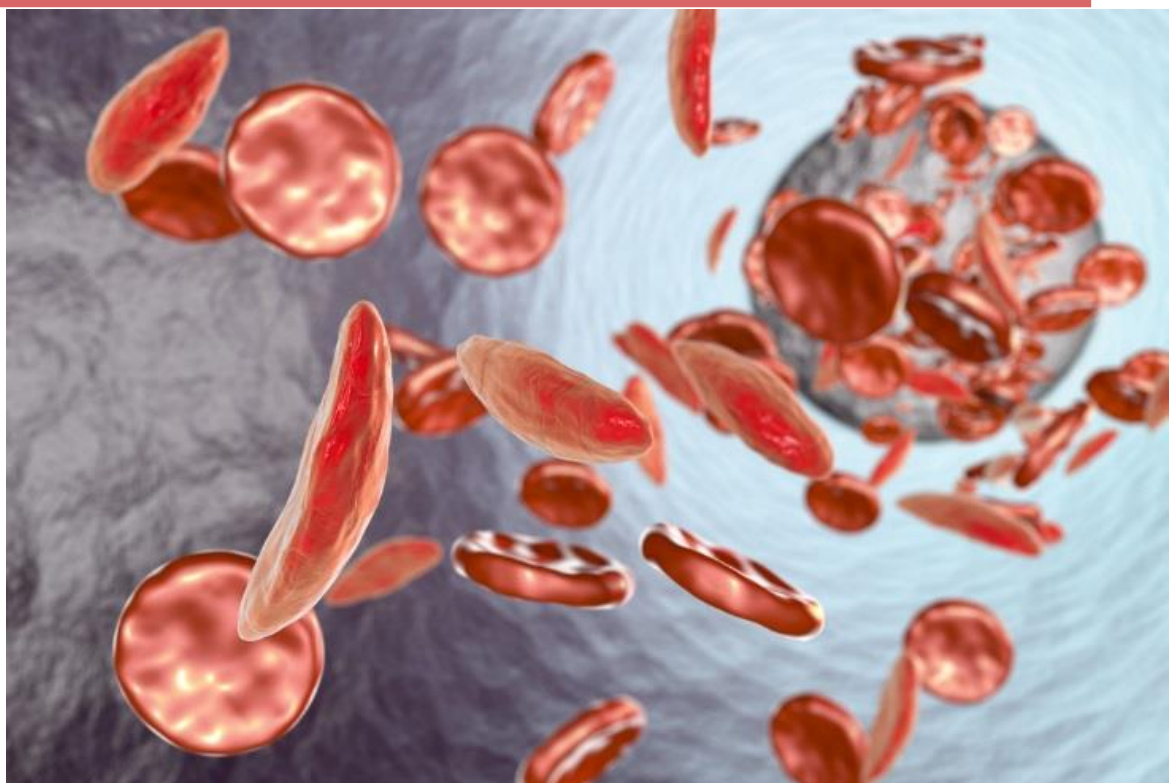
Maria Averina
og **Jan Brox**,
Universitets-
sykehuset Nord-
Norge

Kristin Varsi,
Marta Vorland
og **Aasne**
Aarsand,
Haukeland
universitets-
sykehus

Lene Mikkelsen, Stavanger universitetssykehus

Tor Arne Hagve, Akerhus universitetssykehus

Åshild A. Sudmann-Day, **Runa M. Grimholt**, **Bente Fjeld** og **Olav Klingenberg** (leder),
Oslo universitetssykehus



Innhold

Innledning.....	3
1. Analyseutvalg i anbefalt basisrepertoar	4
Analyser og anbefalinger:	4
o Argumenter for at gap-PCR bør utføres hos alle uavhengig av MCH-verdi.....	4
o Argumenter mot at gap-PCR bør utføres hos alle uavhengig av MCH verdi.....	5
2. Hvilke resultater skal medføre undersøkelser utover anbefalt basisrepertoar?.....	5
Hemoglobin-varianter	5
Andre funn som bør medføre undersøkelser utover anbefalt basisrepertoar.....	6
3. Cut-off / gråsoner for HbA2	7
4. Vurdering av økt HbF som primærfunn	8
5. Utforming av standardbesvarelser.....	8
Tabell 1. Mulige kliniske konsekvenser i neste generasjon ved kombinasjoner av mutasjoner i α -globin-genene.....	9
Tabell 2. Mulige kliniske konsekvenser i neste generasjon ved kombinasjoner av mutasjoner i β -globin-genet	10
6. Informasjonsskriv	11
7. Tilfeldig funn av Hb-variant ved HbA1c-analyse.....	11
Referanser.....	11
Appendiks 1: Status per april 2021 for analyserepertoar ved de største norske laboratoriene	12
Appendiks 2: Eksempler på besvarelsestekst:.....	13

Innledning

Arbeidsgruppe for utredning av hemoglobinopatii ved medisinsk biokjemiske laboratorier ble nedsatt av Norsk selskap for medisinsk biokjemi i 2014. Arbeidet har i hovedsak foregått via mail, med unntak av et lokalt møte i Oslo med begrenset deltakelse i 2014, spredte møter ved Etterutdanningskurset i medisinsk biokjemi i Tromsø i 2014 samt et møte ved Etterutdanningskurset i medisinsk biokjemi i Oslo i 2017 der det også ble gitt en midlertidig rapport fra arbeidet.

Det har foregått en nyttig diskusjon innad i gruppen, blant annet i forhold til diagnostisk- versus prediktiv testing, laboratoriets- versus rekvirentens ansvar og klargjøringer vedrørende genetisk testing.

Allerede ved gruppens første møte i mai 2014 ble man enige om følgende avgrensninger av arbeidsområdet:

A. Arbeidsgruppens mandat omfatter ikke å funksjonsfordele hemoglobinopatiutredning mellom norske laboratorier, men å komme med anbefalinger for analyserepertoar og hvilke funn som bør verifiseres/utredes videre.

B. Det inngår ikke i gruppens mandat å arbeide for innføring av screening for talassemi/sigdcellesykdom i Norge.

De viktigste arbeidsfeltene for gruppen:

- [1. Analyseutvalg](#) i anbefalt basisrepertoar (se også [appendiks 1](#) for nasjonal status i dag)
- [2. Hvilke resultater skal medføre undersøkelser utover anbefalt basisrepertoar?](#)
- [3. Cut-off/gråsoner for HbA2](#)
- [4. Vurdering av økt HbF som primærfunn](#)
- [5. Utforming av standardbesvarelser](#) (se også [appendiks 2](#) for eksempler)
- [6. Informasjonsskriv](#)
- [7. Tilfeldige funn av Hb-variant ved HbA1c-analyse](#)

Disse syv arbeidsfeltene er omtalt under. Vedrørende indikasjoner for hemoglobinopatiutredning henvises det til Nasjonal brukerhåndbok i medisinsk biokjemi (<https://brukerhandboken.no/>).

1. Analyseutvalg i anbefalt basisrepertoar

Analyser og anbefalinger:

- Maskinell hematologi (Hb, MCH, RBC) bør utføres for alle pasienter. MCV bør ikke brukes til vurdering annet enn for prøver tatt innen siste 8 timer. I tillegg kan retikulocythemoglobin være nyttig for å vurdere jernmangel og eventuell transfusjon.
- Biokjemisk jernstatus bør utføres for alle pasienter. Ferritin kan analyseres for å avdekke jernmangel som differensialdiagnose (evt. tilleggsdiagnose) til talassemi. CRP analyseres gjerne som en hjelp i vurderingen av ferritin-konsentrasjonen, som øker ved akutfase/aktiv prosess. Andre mål for jernstatus som transferrinmetning, transferrin reseptor osv. kan også være aktuelle. En bør være klar over at transferrin reseptor ofte er (lett) økt ved β -talassemi-tilstander, sannsynlig pga. ineffektiv erythropoiese (4).
- Hemoglobintyping anbefales utført for alle prøver, ved HPLC og/eller kapillærelektroforese. Andre metoder kan være aktuelle.
- α -talassemi gentest (gap-PCR) (2) for «de syv vanligste α -talassemi-delesjonene» (- α 3.7, - α 4.2, --SEA, --Thai, --Fil, --Med, -(α)20.5). Metoden avdekker ca. 90 % av alle tilfeller med α -talassemi. Gap-PCR anbefales utført på alle med påvist redusert MCH, også dersom pasienten har fått påvist β -thalassemia minor eller jernmangel. Ved samtidig β -talassemi gir oftest ikke α -talassemi ytterligere hematologiske endringer utover det en kan forvente ved en β -thalassemia minor alene. α -talassemi og jernmangel kan også forekomme samtidig.
Gruppen har diskutert hvorvidt gap-PCR skal anbefales utført på alle prøver uavhengig av MCH-nivå eller kun anbefales utført ved påvist mikrocytose, men ikke kommet til enighet på dette punkt. Argumentasjonen er gjengitt under:

- **Argumenter for at gap-PCR bør utføres hos alle uavhengig av MCH-verdi:**

1. Det foreligger hyppig normal MCH ved heterozygot - α 3.7-delesjon og - α 4.2-delesjon. Registrering ved Oslo universitetssykehus (OUS) for årene 2017-2018 viser at 22 % av alle voksne pasienter og 42 % av alle barn 6-17 år som var heterozygote for en av disse delesjonene hadde MCH større eller lik nedre referansegrense for alderen, henholdsvis 27,0 pg og 25,0 pg (N=227). I populasjonen sett under ett hadde 27 % normal MCH. - α 3.7-delesjon er den klart vanligste α -talassemi-mutasjonen. Heterozygoti for - α 3.7-delesjon eller - α 4.2-delesjon utgjorde 62 % av Gap-PCR-påviste α -talassemier ved OUS 2017-2018 (N=422). En rutine som baserer seg på redusert MCH for at en skal utføre

Gap-PCR vil således overse ca. 17 % av alle α -talassemier som er påvisbare ved Gap-PCR.

Å overse slik ett-gens delesjon vil kunne medføre at et par som er blitt utredet for talassemi før konsepsjon likevel overraskende kan få et barn med HbH-sykdom (3 av 4 α -gener utslukket) som gir kronisk hemolyse og splenomegali.

2. Gap-PCR er en forholdsvis enkel og robust analyse uten store kostnader, og Gap-PCR som del av basisutredning gir god arbeidsflyt som bidrar til kortere svartider.

○ **Argumenter mot at gap-PCR bør utføres hos alle uavhengig av MCH verdi:**

1. $-\alpha 3.7$ -delesjon er en mild mutasjon som selv i kombinasjon med to-gensdelesjon oftest gir relativt mild HbH-sykdom (3).
2. Testing for α -talassemi i fravær av mikrocytose kan potensielt betraktes som prediktiv testing.

2. Hvilke resultater skal medføre undersøkelser utover anbefalt basisrepertoar?

Hemoglobin-varianter

- Alle Hb-varianter skal verifiseres. Heterozygot Hb C/D/S/E kan enten verifiseres ved annen proteinmetode (f.eks. HPLC + kapillærelektroforese) eller ved DNA-sekvensering. Verifisering ved annen proteinmetode forutsetter at andel av variant, hematologi og etnisitet passer. Alle andre varianter DNA-sekvenseres.

Begrunnelse for anbefaling: Både de britiske (1) og EMQN (European Molecular Genetics Quality Network) (2) retningslinjene er klare på at bruk av to ulike metoder er nødvendig, fordi den begrensede oppløsningen en har med HPLC eller CE alene (som er de teknikker som er aktuelle i Norge i dag) ikke er tilstrekkelig til å skille alle varianter. Kombinasjonen av to ulike proteinmetoder gir vesentlig bedre oppløsning, og er anbefalt i de britiske retningslinjene. Kombinasjonen av en proteinmetode (HPLC eller CE) og DNA-sekvensering gir imidlertid klart den beste og sikreste

identifikasjonen av både vanlige og sjeldne varianter, bedre enn HPLC+CE, men er ressurskrevende.

Typiske funn ved de vanligste variantene:

Hb E: Kombinasjonen av etnisitet Sørøst-Asia, lett mikrocytose (eller lavnormal MCH), heterozygot variant i HbA₂-vindu ved HPLC, og heterozygot variant i HbE-sone (sone 4) ved CE med andel ca 25% av hemoglobinet, er svært sannsynlig HbA/E (heterozygot HbE). Samtidig α -talassemi reduserer andelen HbE noe (3).

HbC: Kombinasjonen av etnisitet Vest-Afrika, heterozygot variant (30-40%) i HbC-vindu ved HPLC (karakteristisk smal topp med en til to mindre topper som eluerer litt før), og heterozygot variant i HbC-sone (sone 2) på CE er meget sannsynlig heterozygot HbC.

HbS: Kombinasjonen av etnisitet Afrika/Arabiske land/India, normal hematologi, heterozygot variant (35-40%) i HbS-vindu ved HPLC, og heterozygot variant i HbS-sone (sone 5) ved CE er meget sannsynlig heterozygot HbS. α -globinvarianten Hb Kurdistan eluerer/migrerer som HbS ved HPLC/CE, men med mindre andel av hemoglobinet dersom det ikke er samtidig α -talassemi.

HbD-Punjab: Kombinasjonen av etnisitet India, normal hematologi, heterozygot variant (35-45%) i HbD-vindu ved HPLC, og heterozygot variant i HbD-sone (sone 6) ved CE er sannsynlig heterozygot HbD-Punjab. HbD-Punjab forekommer også i etnisk norsk befolkning. Hb Sogn, en β -globin-variant som forekommer i norsk befolkning, eluerer/migrerer som HbD-Punjab ved HPLC/CE, vanligvis i en andel av ca. 30%.

Dersom andel av variant (HbE, HbC, HbS, HbD-Punjab), etnisitet eller andre funn ikke stemmer, eller dersom sikkerheten av svaret har betydelig konsekvens for videre behandling/genetisk veiledning, bør i stedet DNA-sekvensering benyttes som bekreftende metode.

Andre funn som bør medføre undersøkelser utover anbefalt basisrepertoar

- **Uforklart lav MCH** (under nedre referansegrense for alder) etter at basisutredning inkludert Gap-PCR er utført. Vurderes individuelt avhengig av problemstilling.

- Dersom det kan foreligge jernmangel eller anemi ved langvarig/kronisk sykdom, kan en oftest be om ny prøve når jernmangel er adekvat behandlet eller pasienten er blitt frisk av sykdom. Dette er nødvendig av kapasitetshensyn og fordi mikrocytose ved jernmangel og til dels ved kronisk sykdom omfatter en stor pasientgruppe.
- Etter fertil alder: Ved lett redusert MCH (25-27 pg) kan nytteverdi av eventuell DNA-sekvensering vurderes i hvert enkelt tilfelle, da påvisning av en eventuell lett α -talassemi (ett-gens affeksjon) har liten praktisk konsekvens. For kvinner vil ca. 50-års alder være en naturlig grense for fertil alder, for menn bør det brukes skjønn.
- HbA2-gråsoner (jfr. pkt. 3 i neste avsnitt)
- Mistanke om andre sjeldne hemoglobinopatier (f.eks. polycytemi med mistanke om Hb-variant med økt oksygenaffinitet, met-hemoglobin, uforklart hemolytisk anemi med mistanke om ustabil Hb-variant etc.).

3. Cut-off / gråsoner for HbA2

- HbA2 nivå må vurderes sammen med hematologiske funn samt resultater fra øvrige analyser.
- I de fleste tilfeller stilles diagnosen β -thalassemia minor basert på funn av mikrocytose kombinert med økt HbA2-konsentrasjon.
- HbA2 > 4,0-ca 8 % kombinert med typisk hematologi gir diagnosen β -thalassemia minor.
- HbA2-verdier mellom ca. 3,6% og 4,0% er en gråsoner, men i mange tilfeller vil HbA2-verdi i øvre del av denne gråsonen sammen med typiske hematologiske funn være tilstrekkelig for diagnosen. Genetisk utredning utføres etter individuell vurdering.
- HbA2-verdier fra 3,3-3,5% kan i sjeldne tilfeller ses ved lette β -talassemi-mutasjoner. Disse bør verifiseres genetisk.
- Tilstedeværelse av jernmangel eller α -talassemi kan gi lett reduksjon av HbA2. Hvert laboratorium må vurdere eget HbA2 nivå i forhold til de ovenfor foreslåtte grenseverdier. Ulike analyseinstrumenter måler ikke HbA2-konsentrasjonen helt likt, og analyseresultatet vil også påvirkes av analytisk variasjon. En må derfor følge nøye med på HbA2-nivå ved intern- og ekstern kvalitetskontroll.

4. Vurdering av økt HbF som primærfunn

- Isolert, lett økt HbF opp til 3-5% er et uspesifikt funn som kan ses ved flere benmargssykdommer, ved tilstander med erytropoietisk stress, ved graviditet, ved noen solide cancere og ved enkelte polymorfismer i β -globin gen-clusteret (non-deletional HPFH). Enkelte benmargssykdommer kan også gi betydelig høyere HbF-konsentrasjoner enn 5 %.
- Utover kopinummeranalyse som kan fange opp $\delta\beta$ -talassemi og delesjonsbetinget HPFH er det svært begrenset mulighet for videre genetisk utredning av økt HbF i Norge. Sekvensering av γ -globin promotor kan påvise sekvensvarianter som gir lett økt HbF. Dette er imidlertid i de fleste tilfeller av liten klinisk betydning og behøver vanligvis ikke utredes.
- Ved mistanke om $\delta\beta$ -talassemi (HbF ca. 5-15% og lett mikrocytose) anbefales verifisering ved kopinummeranalyse.
- Ved mistanke om delesjonsbetinget hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH) (HbF > ca. 15% og ofte (lav-) normal MCH anbefales verifisering ved kopinummeranalyse.

5. Utforming av standardbesvarelser

Gjennomgang av svartekster fra de ulike laboratoriene viser at det er behov for mange forskjellige tekster og for individuell tilpasning i mange tilfeller. Vi anbefaler at svarteksten inneholder informasjon om følgende elementer:

- i) oppgitte kliniske opplysninger/etnisitet
- ii) kort resymé av hematologi
- iii) funn ved utførte analyser
- iv) forklarer funnene hematologien?
- v) råd i forhold til arv/reproduksjon (se tabell 1 og 2 for veiledning)
- vi) konklusjon

Noen [eksempler](#) på besvarelestekst som kan brukes som utgangspunkt finnes i appendiks 2 til slutt i dette dokumentet.

Tabell 1. Mulige kliniske konsekvenser i neste generasjon ved kombinasjoner av mutasjoner i α -globin-genene

	To-gens α-delesjon	Ett-gens α-delesjon	Ikke-delesjons-betinget α-thal.
To-gens α-delesjon	Barts hydrops f�talis (1)		
Ett-gens α-delesjon	HbH-sykdom (mild form) (1)	Thal. minor fenotype (1)	
Ikke-delesjons-betinget α-thal	HbH-sykdom (alvorlig form) (1)	Thal. minor fenotype	Thal minor til HbH sykdom (1) Rapportert hydrops (Hb Adana)(7,8)

Tabell 2. Mulige kliniske konsekvenser i neste generasjon ved kombinasjoner av mutasjoner i β -globin-genet

	β -thal. minor	$\delta\beta$ -thal.	HbS	HbD-Punjab	HbC	HbE	Hb O-Arab
β-thal. minor	β -thal. major (1)						
$\delta\beta$-thal.	β -thal. intermedia til major (1)	β -thal. intermedia (1)					
HbS	Alvorlig sigdcellesykdom (1)	Mild sigdcellesykdom (1)	Alvorlig sigdcellesykdom (1)				
HbD-Punjab	Mild tilstand (1)	Mild tilstand (1)	Alvorlig sigdcellesykdom (1)	Mild tilstand (1)			
HbC	Thal. minor til intermedia (1) hemolyse (5)		Sigdcellesykdom, variabel alvorlighet		Mild kronisk hemolytisk anemi (3,4,5)		
HbE	Thal. intermedia til major	β -thal. intermedia (mild) (9)	Mild til alvorlig sigdcellesykdom (1)	Mild tilstand (2)		Mild hemolytisk anemi, mikrocytose (4)	
Hb O-Arab	Alvorlig thal. intermedia (1)	β -thal. intermedia (mild) (9)	Alvorlig sigdcellesykdom (1)		Mild tilstand, splenomegali (6)		Hemolytisk anemi (5)
α-triplikasjon	Thal. intermedia (10)						

Referanser til tabellene:

1. European Journal of Human Genetics, 2015; 23, 426–437
2. Hemoglobin, 2002; 26:3, 261-269
3. Hemoglobin, 2012; 37:1, 16-25
4. HbVar-database
5. Dacie and Lewis Practical Haematology (Twelfth Edition), Ch. 14: Investigation of Variant Haemoglobins and Thalassaemias
6. N Engl J Med. 1970; 283:26, 1417-25
7. Hemoglobin. 2010; 34: 394–401
8. Pediatr Blood cancer, 2018; 65:e27220
9. <https://www.nhs.uk/conditions/thalassaemia/carriers/>
10. British Journal of Haematology, 1996, 95, 467–471

6. Informasjonsskriv

- Nasjonal brukerhåndbok i medisinsk biokjemi:

<https://brukerhandboken.no/index.php?action=showtopic&topic=d08906aa03572fe448da&j=1>

7. Tilfeldig funn av Hb-variant ved HbA1c-analyse

- Det anbefales at prøven *ikke* sendes direkte til hemoglobinopatiutredning ved tilfeldig funn av Hb-variant ved HbA1c-analyse ved kromatografi eller CE. Dette fordi pasient og lege bør ha mulighet til å diskutere en eventuell utredning først.
- Det anbefales å gi ut en kommentar til HbA1c-analysen om funn av mulig Hb-variant og informasjon om mulighet for hemoglobinopatiutredning dersom det ikke er utført tidligere. Mulig tekst: "Sannsynlig heterozygot hemoglobinvariant. Dersom hemoglobinvariant ikke er kjent fra tidligere kan hemoglobinopatiutredning rekvireres."

Referanser i tekst:

1. British Journal of Haematology, 2010;149: 35–49
2. European Journal of Human Genetics 2015;23: 426–437
3. Orphanet Journal of Rare Diseases 2010;5:13
4. Blood. 1990 Jan 1;75(1):102-7.

Appendiks 1: Status per april 2021 for analyserepertoar ved de største norske laboratoriene

Analyse	Riks- hospitalet	Ullevål	Ahus	Hauke- land	St. Olav	Tromsø	Tøns- berg	Fürst
Maskinell hematologi	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferritin	+	+	+	+	(+)	(+)	+	+
CRP	+	+	+	+	(+)	(+)	+	+
HPLC	+	+	+			+	+	
Kapillær- elektroforese	+	+	+	+	+	+		+
Gap-PCR	+	+	+	+				+
Sekvensering β		+	+	+				
Sekvensering α		+		+				
Sekvensering δ		+						
Sekvensering γ promotor		+						
Kopinumner α		+						
Kopinumner β		+						
Annet	HbH- utstryk	PCR Hb Lepore						PCR anti- 3.7
		HbH- utstryk						

Forklaring til tabellen: Ferritin og PCR i parentes (+) betyr at analysene ikke inngår automatisk i utredningen.

Appendiks 2: Eksempler på besvarelestekst:

NORMAL (VOKSEN + BARN >1 ÅR)

Problemstilling: Ikke oppgitt.

Etnisk opprinnelse: Ikke oppgitt.

Vurdering: Pasienten har normal hematologi. Det foreligger et normalt hemoglobinmønster med en normal, dominerende HbA og normal HbA₂, hvilket utelukker de vanligste hemoglobinvariantene og β -talassemi. Det påvises heller ikke α -talassemi ved gentest for de syv vanligste delesjonene.

Konklusjon: Verken hemoglobinvariant eller talassemi påvist.

Signatur

β -THALASSEMIA MINOR (VOKSEN)

Problemstilling: Ikke oppgitt.

Etnisk opprinnelse: Ikke oppgitt.

Vurdering: Pasienten har mikrocytose og erythrocytose. Hemoglobintyping viser økt HbA₂ i tillegg til en dominerende, normal HbA, forenlig med β -thalassemia minor. Funnet passer med de hematologiske forandringene. Dersom ektefelle/partner også har β -talassemi eller en av hemoglobinvariantene HbE eller HbS, kan eventuelle barn arve alvorlige former for hemoglobinopati. Det påvises ikke α -talassemi ved gentest for de syv vanligste delesjonene.

Konklusjon: β -thalassemia minor påvist.

Signatur

HETEROZYGOT HbS

Problemstilling: Ikke oppgitt.

Etnisk opprinnelse: Ikke oppgitt.

Vurdering: Pasienten har normal hematologi. Hemoglobintyping ved HPLC og sekvensering av β -globingenet viser at pasienten er heterozygot for hemoglobinvarianten HbS (HBB:c.20A>T, HbVar ID 226). Denne hemoglobinvarianten i heterozygot form gir ikke hematologiske forandringer. Dersom ektefelle/partner har en hemoglobinvariant (HbS, HbD-Punjab, HbC, HbE eller HbO-Arab) eller β -talassemi, kan eventuelle barn arve alvorlig sigdcellesykdom. Det påvises ikke β -talassemi, og α -talassemi gentest for de syv vanligste delesjonene er normal.

Konklusjon: Heterozygot HbS påvist.

Signatur