EDU THALASSEMIA
Portal Edukasi Thalassemia |
Thalassemia Learning Centre

Deteksi Thalassemia

PEMERIKSAAN LABORATORIUM

Alur deteksi thalassemia

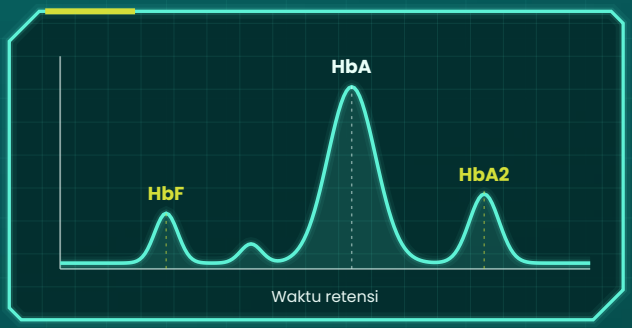
01
Hematologi Rutin
Hb, MCV, MCH, RDW
Mikrositik hipokromik

02
Apusan Darah Tepi
Sel target
Anisopoikilositosis

03
Analisis Hemoglobin
Elektroforesis / HPLC
Kadar HbA2 dan HbF

04
Analisis Molekuler
PCR dan sekuensing
Gen HBA dan HBB

Skrining — Konfirmasi — Diagnosis definitif



Kromatogram HPLC



Elektroforesis hemoglobin

Author

BN Dr. Betty Nurhayati, S.Si., M.Si.

Head Office

Poltekkes Kemenkes Jakarta III
Jl. Arteri JORR Jatiwarna, Pondok Melati,
Bekasi 17415
Telepon : (021) 84978693
Fax : (021) 84978694

D. DETEKSI THALASEMIA

Sindrom talasemia adalah kelompok heterogen kelainan hemoglobin akibat berkurangnya atau tidak adanya produksi rantai globin normal (Brancaleoni, 2016). Diagnosis thalasemia ditegakkan dengan anamnesis, pemeriksaan fisik, dilanjutkan dengan pemeriksaan laboratorium dan bila perlu dilakukan analisis DNA. Penegakan diagnosis diawali dari kecurigaan klinis yang didukung riwayat pada keluarga dan pemeriksaan awal. Konfirmasi dengan analisis hemoglobin atau genetik dikerjakan di layanan rujukan yang memiliki fasilitas tersebut (Paloma, 2023). Beberapa pemeriksaan yang mengarahkan diagnosis talasemia adalah sebagai berikut (Kemenkes RI. 2018; Paloma, 2023).

1. Anamnesis :

a) Pucat kronik; usia awitan terjadinya pucat perlu ditanyakan. Pada thalassemia β/HbE usia awitan pucat umumnya didapatkan pada usia yang lebih tua.
b) Riwayat transfusi berulang; anemia pada thalassemia mayor memerlukan transfusi berkala.
c) Riwayat keluarga dengan thalassemia dan transfusi berulang. Riwayat keluarga dan penderita sangat penting dalam mendiagnosis talasemia karena beberapa ras dan etnik tertentu memiliki potensi tinggi terjadi abnormalitas pada gen talasemia yang spesifik.
d) Perut buncit; perut tampak buncit karena adanya hepatosplenomegali.
e) Etnis dan suku tertentu; angka kejadian thalassemia lebih tinggi pada ras Mediterania, Timur Tengah, India, dan Asia Tenggara. Thalassemia paling banyak di Indonesia ditemukan di Palembang 9%, Jawa 6-8%, dan Makasar 8%.
f) Riwayat tumbuh kembang dan pubertas terlambat (Kemenkes RI, 2018).

2. Pemeriksaan Fisik

Pemeriksaan fisik juga penting untuk mengarahkan diagnosis talasemia. Pada talasemia terdapat tanda dan gejala seperti pucat yang menunjukan anemia, ikterus yang menunjukan hemolitik, splenomegali yang menunjukan adanya penumpukan sel abnormal, dan deformitas skeletal terutama pada talasemia beta mayor. Beberapa karakteristik yang dapat ditemukan dari pemeriksaan fisik pada anak dengan

thalassemia yang bergantung transfusi adalah pucat, sklera ikterik, facies Cooley (dahi menonjol, mata menyipit, jarak kedua mata melebar, maksila hipertrofi, maloklusi gigi), hepatosplenomegali, gagal tumbuh, gizi kurang, perawakan pendek, pubertas terlambat, dan hiperpigmentasi kulit.

3. Pemeriksaan Laboratorium

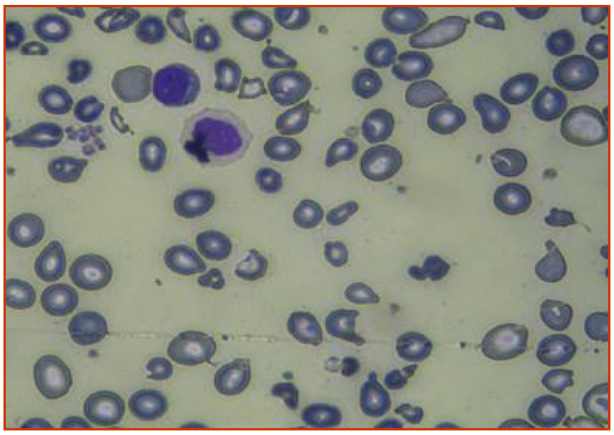
Darah lengkap (DL)

a) Ditemukan anemia dengan kadar Hb 2-8 g/dL, namun kadar Hb yang normal tidak menyingkirkan kemungkinan thalasemia trait. Terkadang disertai leukositosis dan trombositosis karena hiperplasia sumsum tulang atau pansitopenia pada pasien dengan splenomegali berat. Anemia yang dijumpai pada thalassemia mayor cukup berat dengan kadar hemoglobin mencapai <7,0 g/dL.
b) Hemoglobinopati seperti Hb Constant Spring dapat memiliki MCV dan MCH yang normal, sehingga nilai normal belum dapat menyingkirkan kemungkinan thalassemia trait dan hemoglobinopati.
c) Indeks eritrosit merupakan langkah pertama yang penting untuk skrining pembawa sifat thalassemia (trait), thalassemia $\delta\beta$, dan high Persisten fetal hemoglobine (HPFH)13.
d) Mean corpuscular volume (MCV) < 80 fL (mikrositik) dan mean corpuscular haemoglobin (MCH) < 27 pg (hipokromik). Thalassemia mayor biasanya memiliki MCV 50 – 60 fL dan MCH 12 – 18 pg.
e) Nilai MCV dan MCH yang rendah ditemukan pada thalassemia, dan juga pada anemia defisiensi besi. MCH lebih dipercaya karena lebih sedikit dipengaruhi oleh perubahan cadangan besi (*less suscpetible to storage changes*) (Kemenkes RI, 2018).

Gambaran darah tepi

a) Pada apus darah tepi ditemukan gambaran beberapa kelainan eritrosit, seperti: anisositosis dan poikilositosis yang nyata (termasuk fragmentosit dan tear-drop), mikrositik hipokrom, basophilic stippling, badan Pappenheimer, sel target, mikrosferosit dan eritrosit berinti (menunjukan defek hemoglobinisasi dan diseritropoiesis).
b) Total hitung dan neutrofil meningkat.

c) Bila telah terjadi hipersplenisme dapat ditemukan leukopenia, neutropenia, dan trombositopenia.



Gambar 10. Gambaran darah tepi pada thalassemia mayor

Red Cell Distribution Width (RDW)

Red Cell Distribution Width (RDW) merupakan perhitungan secara statistik dispersi rata-rata ukuran sel dan bukan parameter terukur seperti MCV, melainkan perhitungan otomatis dari hasil pemeriksaan rutin. Pemeriksaan kon- firmasi menggunakan sediaan apus darah tepi perlu dilakukan dengan tujuan mencari sel eritrosit abnormal yang berkontribusi terhadap peningkatan nilai RDW ataupun MCV. RDW terbagi menjadi dua jenis, yaitu RDW-CV dan RDW-SD. Koefisien variasi sel darah merah (RDW-CV) mengukur heterogenitas sel darah merah per volume darah yang dinyatakan dalam persen (%) dengan nilai normal 11–16%. Distribusi standar sel darah merah (RDW-SD) dinyatakan sebagai standar deviasi dalam satuan femtoliter (fL) dengan nilai normal 39–46 fL (Putra & Bintoro, 2019).

RDW menyatakan variasi ukuran eritrosit. Anemia defisiesi besi memiliki RDW yang meningkat >14,5%, tetapi tidak setinggi seperti pada thalassemia mayor. Thalassemia trait memiliki eritrosit mikrositik yang uniform sehingga tidak / hanya sedikit ditandai dengan peningkatan RDW. Thalassemia mayor dan intermedia menunjukkan peningkatan RDW yang tinggi nilainya.

Tabel 1. Gambar darah tepi dan analisis Hb thalassema- β minor dan ADB

Diagnosis	Hb (g/dL)	MCV (fL)	MCH (pg)	RDW (%)
Thalassemia-β minor	12,6 (SB 1,7)	67,2 (SB 7,8)	22,2 (SB 2,8)	16,9 (SB 1,4)
ADB	10 (SB 1,7)	74,3 (SB 6,8)	24,1 (SB 2,1)	(SB 4,0)

Data Divisi Hematologi-Onkologi Dep IKA 2009, (Kemenkes RI, 2018).

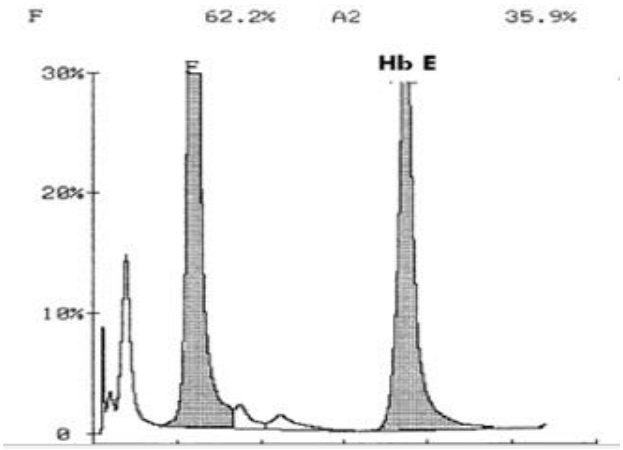
.

Retikulosit

Jumlah retikulosit menunjukkan aktivitas sumsum tulang. Pasien thalassemia memiliki aktivitas sumsum tulang yang meningkat, oleh karena itu hitung retikulosit pada thalasemia biasanya meningkat sedangkan pada anemia defisiensi besi akan diperoleh hasil yang rendah. Pemeriksaan retikulosit cukup sensitif namun kurang spesifik.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

a) Sebagai alat ukur kuantitatif HbA_2 dan HbF, dan dapat dipakai untuk mengidentifikasi dan menghitung varian hemoglobin secara presumtif. Pemeriksaan alternatif dapat dilakukan jika varian hemoglobin yang terdeteksi pada HPLC relevan dengan klinis pasien.
b) HbF dominan (>90%) pada hampir semua kasus thalassemia β berat, kecuali pasien telah menerima transfusi darah dalam jumlah besar sesaat sebelum pemeriksaan. HbA tidak terdeteksi sama sekali pada thalassemia β^0 homozigot, sedangkan HbA masih terdeteksi sedikit pada thalassemia β+. Peningkatan HbA_2 dapat memandu diagnosis thalassemia β trait.
    i. Kadar HbA_2 mencerminkan derajat kelainan yang terjadi.
    ii. HbA_2 3,6-4,2% pada thalassemia β+ ringan.
    iii. HbA_2 4-9% pada thalassemia heterozigot β^0 dan β+ berat.
    iv. HbA_2 lebih dari 20% menandakan adanya HbE. Jika hemoglobin yang dominan adalah HbF dan HbE, maka sesuai dengan diagnosis thalassemia β/HbE.



Gambar 11. Gambaran Analisis Hb dengan metode *High performance liquid chromatography* thalassemia (Kemenkes RI, 2018).

c) HbA_2 normal tidak langsung menyingkirkan diagnosis thalassemia.
   i. HbA_2 dapat menjadi lebih rendah dari kadar sebenarnya akibat kondisi defisiensi besi, sehingga diperlukan terapi defisiensi besi sebelum melakukan HPLC ulang untuk menilai kuantitas subtipe Hb.
   ii. Feritin serum rendah merupakan petunjuk adanya defisiensi besi, namun tidak menyingkirkan kemungkinan thalassemia trait. Bila defisiensi besi telah disingkirkan, nilai HbA_2 normal, namun indeks eritrosit masih sesuai dengan thalassemia, maka dapat dicurigai kemungkinan thalassemia α, atau koeksistensi thalassemia β dan δ.

Elektroforesis Hemoglobin

Beberapa cara pemeriksaan elektroforesis hemoglobin yang dapat dilakukan adalah pemeriksaan Hb varians kuantitatif (electrophoresis cellose acetat membrane), HbA_2 kuantitatif (metode mikrokolom), HbF (alkali denaturasi modifikasi Betke 2 menit), atau pemeriksaan elektroforesis menggunakan capillary hemoglobin electrophoresis.

Analisis DNA

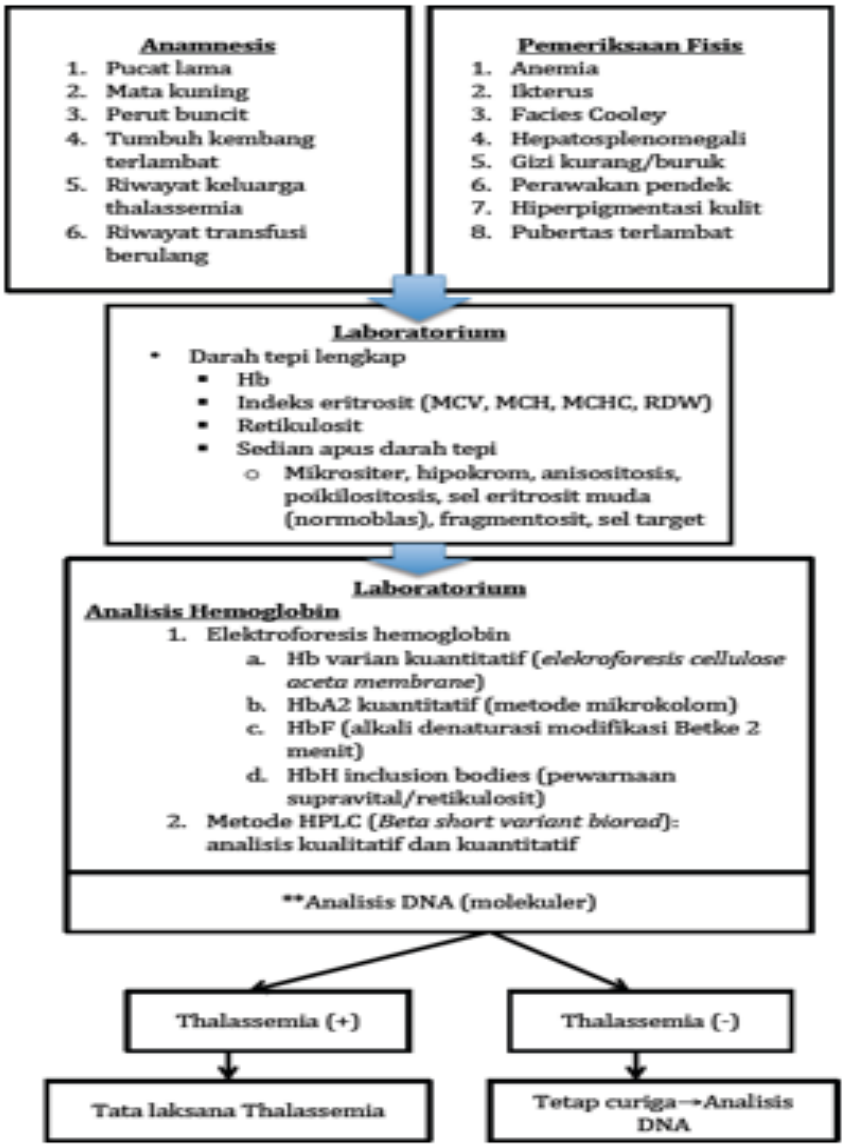
Analisis DNA merupakan upaya diagnosis molekular thalassemia, yang dilakukan pada kasus atau kondisi tertentu:

a) Ketidakmampuan untuk mengonfirmasi hemoglobinopati dengan pemeriksaan hematologi:

i. Diagnosis thalassemia β mayor yang telah banyak menerima transfusi. Diagnosis dapat diperkuat dengan temuan thalassemia β heterozigot (pembawa sifat thalassemia beta) pada kedua orangtua.
ii. Identifikasi karier dari thalassemia β silent, thalassemia β dengan HbA_2 normal, thalassemia α^0, dan beberapa thalassemia α+.
iii. Identifikasi varian hemoglobin yang jarang.

b) Keperluan konseling genetik dan diagnosis prenatal.

4. Alur Diagnosis Thalassemia



Gambar 12. Alur Diagnosis Thalasemia

* Bila sudah transfusi, dapat dilakukan pemeriksaan DPL dan dilanjutkan pemeriksaan analisis Hb kedua orangtua.

** Pemeriksaan DNA dilakukan apabila telah transfusi darah berulang, hasil skrining orangtua sesuai dengan pembawa sifat thalassemia, hasil pemeriksaan esensial tidak khas (curiga ke arah thalassemia delesi 1 gen atau mutasi titik).

Sumber : Perhimpunan Hematologi dan Transfusi darah Indonesia (PHTDI) , Kemenkes RI, 2018.

5. Teknik dan metode skrining

a. Pemeriksaan nilai indeks eritrosit

Hasil skrining terhadap 795 orang menunjukkan bahwa pasien thalassemia α, thalassemia β, dan Hb Lepore semuanya menunjukkan nilai MCV <76 fL dan MCH <25 pg, yang mengindikasikan bahwa kedua nilai tersebut dapat digunakan untuk uji saring awal thalassemia.[96,97] Skrining massal terhadap 289.763 pelajar yang dilakukan Silvestroni dan Bianco menunjukkan bahwa uji saring 2 tahap dengan melihat morfologi darah tepi dan uji fragilitas osmotik sel darah merah 1 tabung yang diikuti dengan pemeriksaan indeks eritrosit dan analisis hemoglobin dapat mendeteksi thalassemia non- β sampai 99,65%.

Penelitian Maheswari terhadap 1.286 perempuan yang melakukan pemeriksaan antenatal menyatakan bahwa angka sensitivitas dan spesifisitas nilai MCV dan MCH dalam identifikasi karier thalassemia berturut-turut adalah 98 % dan 92%. Demikian juga penelitian Rathod menunjukkan penggunaan MCV dan MCH dengan cell counter dapat digunakan dalam deteksi karier thalassemia- β. Galanello menganjurkan nilai MCV <79 fL dan MCH <27 pg sebagai nilai ambang untuk uji saring awal thalassemia-β. (lihat tabel 1). Sementara itu penelitian Rogers dkk menyebutkan nilai cut-off untuk skrining antenatal thalassemia-β pada wanita hamil adalah MCH <27 pg dan MCV <85 fL, dimana nilai MCH lebih superior daripada MCV.

Red Blood Cell Index	Normal [1]		Affected	Carrier [1]
	Male	Female	β-Thal Major	β-Thal Minor
Mean corpuscular volume (MCV fl)	89.1±5.01	87.6±5.5	50-70	<79
Mean corpuscular hemoglobin (MCH pg)	30.9±1.9	30.2±2.1	12-20	<27
Hemoglobin (Hb g/dL)	15.9±1.0	14.0±0.9	<7	Males: 11.5-15.3 Females: 9.1-14

Tabel 2. Nilai MCV dan MCH pada uji saring awal thalassemia-β.

b. Elektroforesis Hemoglobin

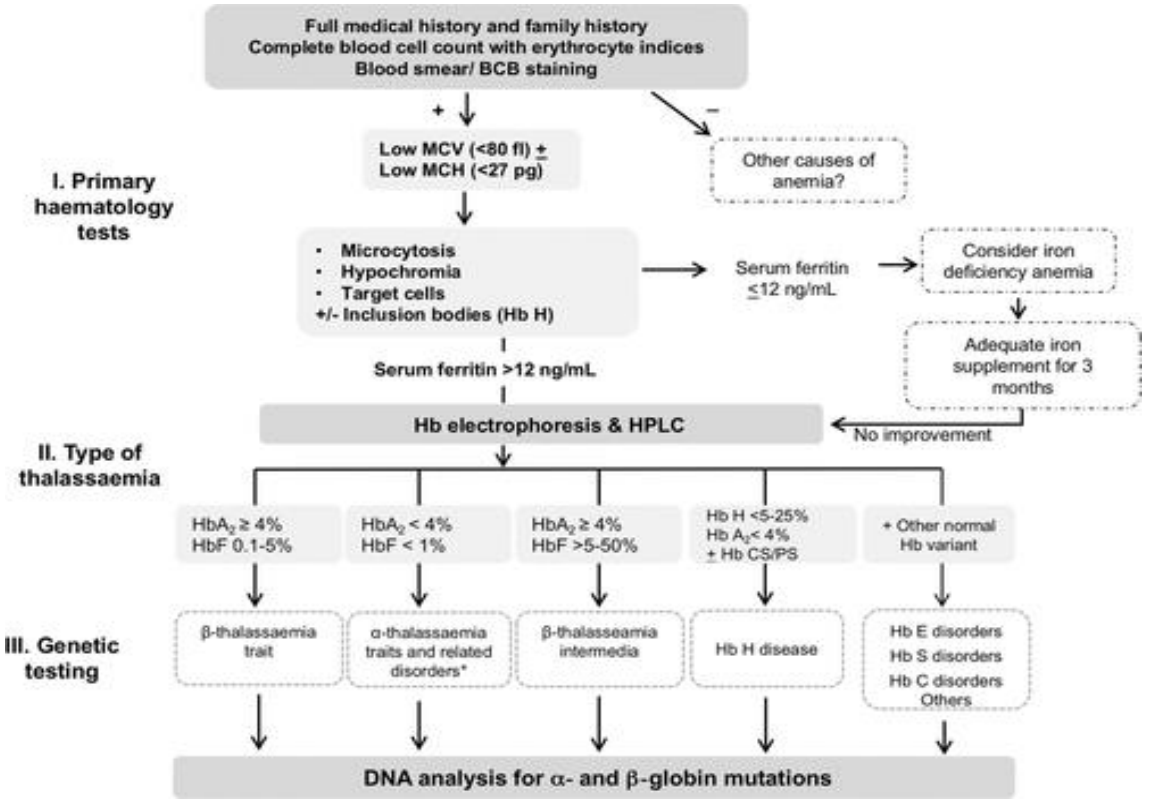
Peningkatan kadar HbA_2 merupakan baku emas dalam menegakkan diagnosis karier thalassemia. Subjek yang positif dalam skrining awal dengan nilai indeks eritrosit dikonfirmasi dengan penilaian kadar HbA_2. Beberapa metode dapat digunakan, seperti kromatografi mikrokolom *(microcolumn chromatography*), *High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)*, *dan capillary iso-electrofocusing*. Diagnosis ditegakkan bila kadar HbA_2 >3,5%.

c. Analisis DNA

Saxena dkk. melaporkan hasil analisis mutasi DNA dengan menggunakan metode *Amplification Refractory Mutation System* (ARMS) pada diagnosis pranatal terhadap 415 kehamilan. Hasilnya menunjukkan bahwa ARMS dapat mengkonfirmasi diagnosis pada 98,3% kasus. Pemeriksaan ini relatif murah dan dapat digunakan untuk diagnosis pranatal.

Metode pemeriksaan thalassemia yang definitif dan akurat meliputi pemeriksaan kualitatif HbA_2, HbF, rasio sintesis rantai globin, dan analisis DNA untuk mengetahui mutasi spesifik, namun semua pemeriksaan ini cukup mahal. Pasien thalassemia selalu mengalami anemia hipokrom (MCH <26 pg) dan mikrositik (MCV <75 fL), karenanya kedua kelainan ini tepat digunakan untuk pemeriksaan awal karier thalassemia. Kemungkinan anemia mikrositik akibat defisiensi besi harus disingkirkan melalui pemeriksaan porfirin eritrosit bebas, feritin serum, atau kadar besi serum, dengan total iron-binding capacity (Kemenkes RI., 2018).

Bagan alur diagnostik untuk mengidentifikasi pembawa talasemia dan talasemia intermedia mengikuti alur pada gambar 13 sebagai berikut :



Gambar 13. Bagan alur diagnostik untuk mengidentifikasi pembawa talasemia dan talasemia intermedia (Sumber: Brancaleoni, 2016)

		β-TM	β-TI	HβE / βThal		HbH
Hb levels		<5g/dL	~7 – 10 g/dL	Mild	9 – 12 g/dL	2.6 – 13.3 g/dL
				Moderately/ Severe	6 – 7 g/dL	
				Severe	4 – 5 g/dL	
BLOODSMEAR	Low Hb Production	Red cell hypochromia microcytosis, Target cells				
	Haemolysis	Irregularly crenated RBC, increased reticulocytes [5 – 10%]				
	Ineffective erythropoiesis	Nucleated RBC, Basophilic stripling				
	Special Features	+Numerous F-cells/ Acid elution	+F-cells/ Acid Elution	+DCIP staining [HbE] +F-cells/ Acid Elution		HbH inclusion bodies
Haemoglobin study		HbF up to 100% HbA2↑	HbF 10 – 50% [up to 100%] HbA2 > 4%	HbE [40 – 60%] HbF [60 – 40%] ±HbA [with β-thal] HbA2↑		Variable HbH [0,8 – 40%] HbA2↓ the presence of a-variants e.g. Hb CS, Hb PS etc.
DNA analysis		• Common known mutations of both β0 and β – thal mutations in population specific set can be done by PCR based methods. • For rare or unusual mutations, direct sequencing or array analysis is required • Other analysis for β-TI included α- and β- globin rearrangements, Xmn I polymorphism and other QTLs for γ-globin expression				Gap-PCR developed for 7 common α-thal deletions and RDB for non-deletional mutations. For unknown mutations, MLPA analysis and sequencing required

Gambar 14. Kriteria diagnostik untuk talasemia dan hemoglobinopati (Dimitrios, dkk. 2021)

Ringkasan metode diagnostik untuk talasemia dan hemoglobinopati. DCIP = diklorofenolindofenol; Hb = hemoglobin; MLPA = amplifikasi probe yang bergantung pada ligasi multipleks. QTL = lokus kuantitatif; PRC = reaksi berantai polimerase; RBC = sel darah merah; RDB = reverse dot blot; TI = talasemia intermedia; TM = talasemia mayor.

Penulis : Dr. Betty Nurhayati, S.Si., M.Si

DAFTAR PUSTAKA

Brancaleoni. 2016. Laboratory of Thalassemia. International Journal Laboratory Hematology.

Dimitrios Farmakis, John Porter, Ali Taher, Maria Domenica Cappellini, Michael Angastiniotis, and Androulla Eleftheriou. 2021. 2021 Thalassaemia International Federation Guidelines for the Management of Transfusion-dependent Thalassemia.

Kemenkes RI. 2018. Pedoman Nasional Pelayanan Kedokteran Tatalaksana Thalasemia. Kepmenkes 2018 Republik Indonesia Nomor HK.01.07/ Menkes/1/2018.

(Nafisa et al., 2020) Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia nomor HK.01.07/menkes/1/2018 Tentang Pedoman nasional pelayanan kedokteran tata laksana thalasemia

Paloma, I Dewa Ayu Natih Cania. 2023. Talasemia: Sebuah Tinjauan Pustaka. Artikel Review. BIOCITY Journal of Pharmacy Bioscience and Clinical Community 1(2): 89-100. Doi:10.30.812/biocity.vli2.2525.