

Institut für Labormedizin

Moderne Analytik der Hämoglobinopathien & Thalassämien



Dr. med. Adriana Méndez

Leitende Ärztin

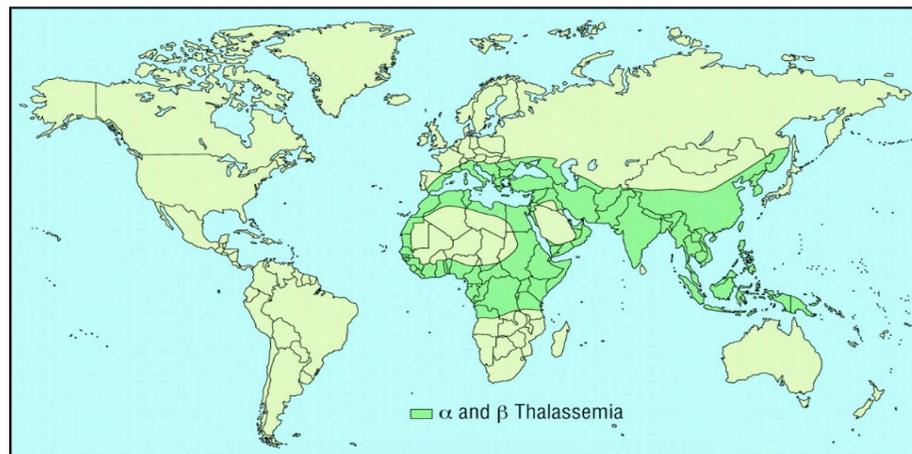
Institut für Labormedizin, Kantonsspital Aarau

Agenda

- Hämoglobinopathien
- Abklärungsalgorithmus
 - Hämatologische Untersuchungen
 - Molekulargenetische Untersuchungen
 - Interdisziplinäre Befundung
- Fallbeispiel

Inzidenz der Hämoglobinopathien

- 5.2% der Weltbevölkerung sind Träger
- 7% der Schwangeren
- Mortalität von ca. 3.4% (6.4% in Afrika) der Kinder unter 5 J
- In Schweiz & Deutschland
 - 50'000 – 400'000 betroffene Menschen
 - Tendenz steigend: Globalisierung, Flüchtlingsströme



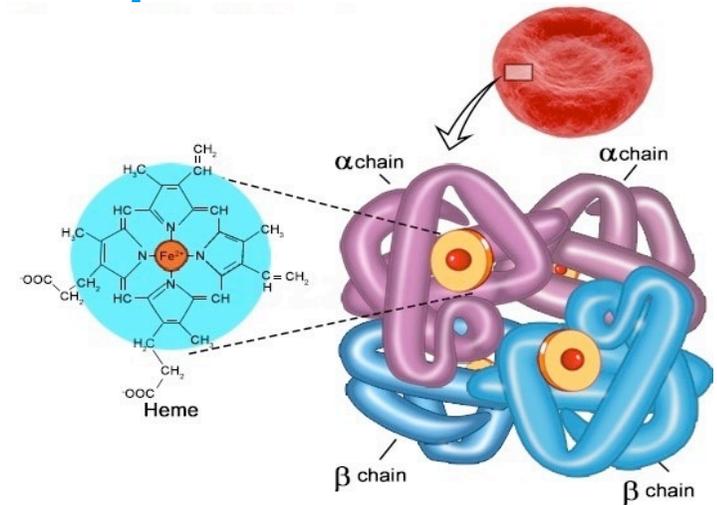
Klassifikation der Hämoglobinopathien

Abnormales Hämoglobin

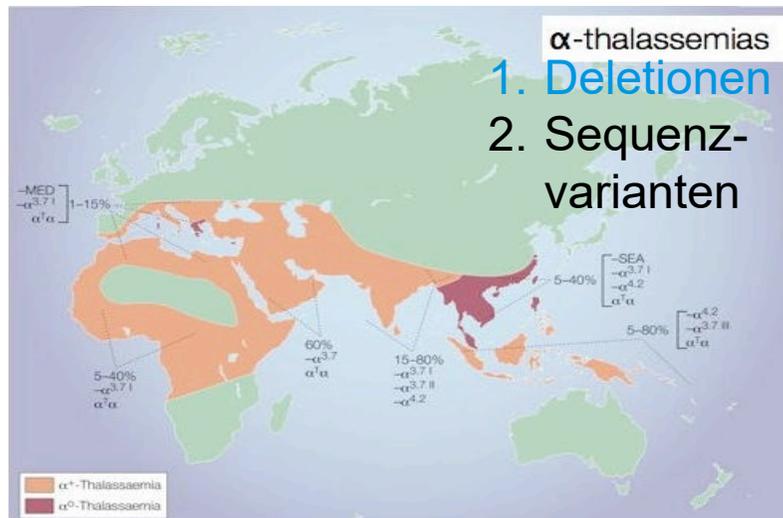
Qualitative strukturelle Veränderung des Hämoglobins

Thalassämie

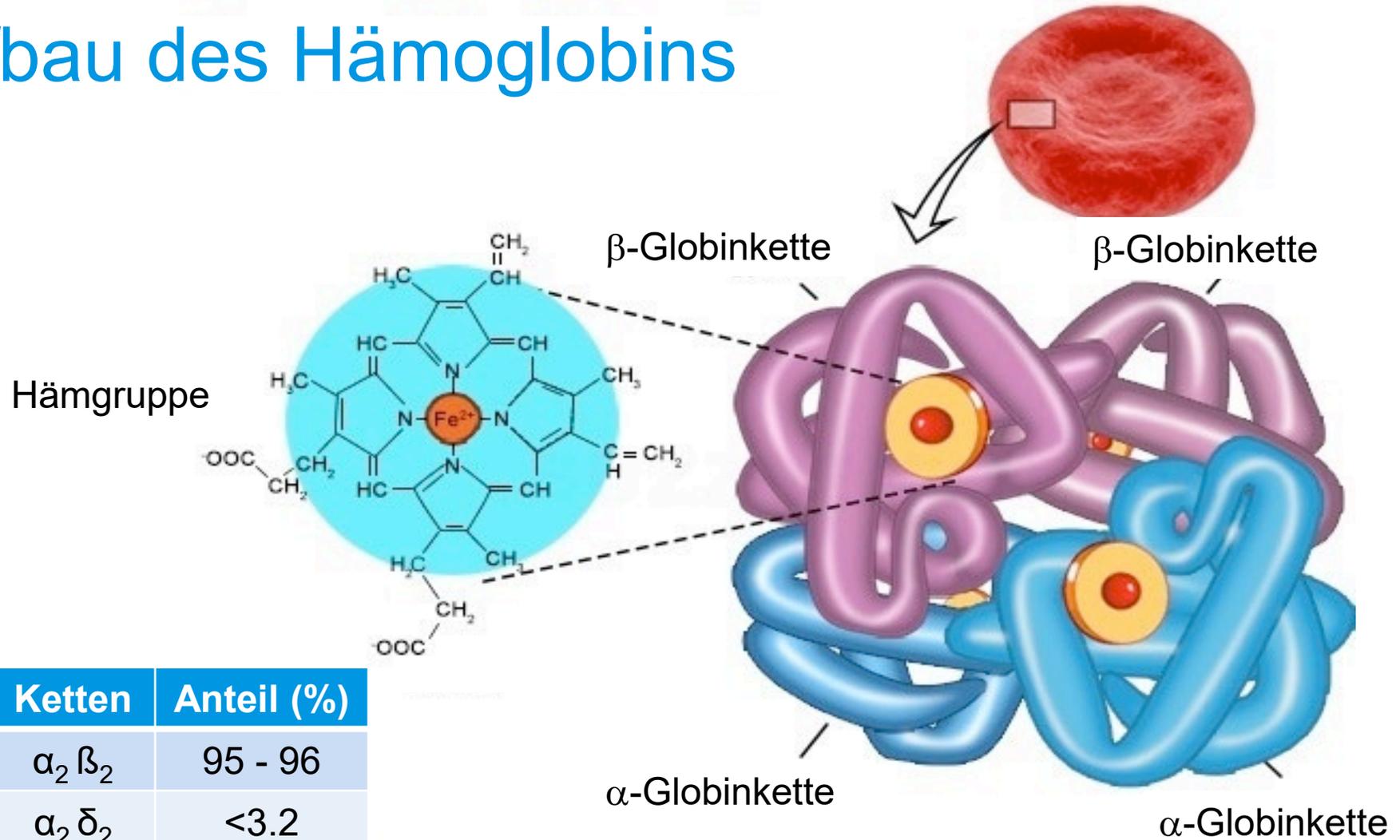
Quantitative Veränderung der Hämoglobinsynthese



Auftreten der Mutationen

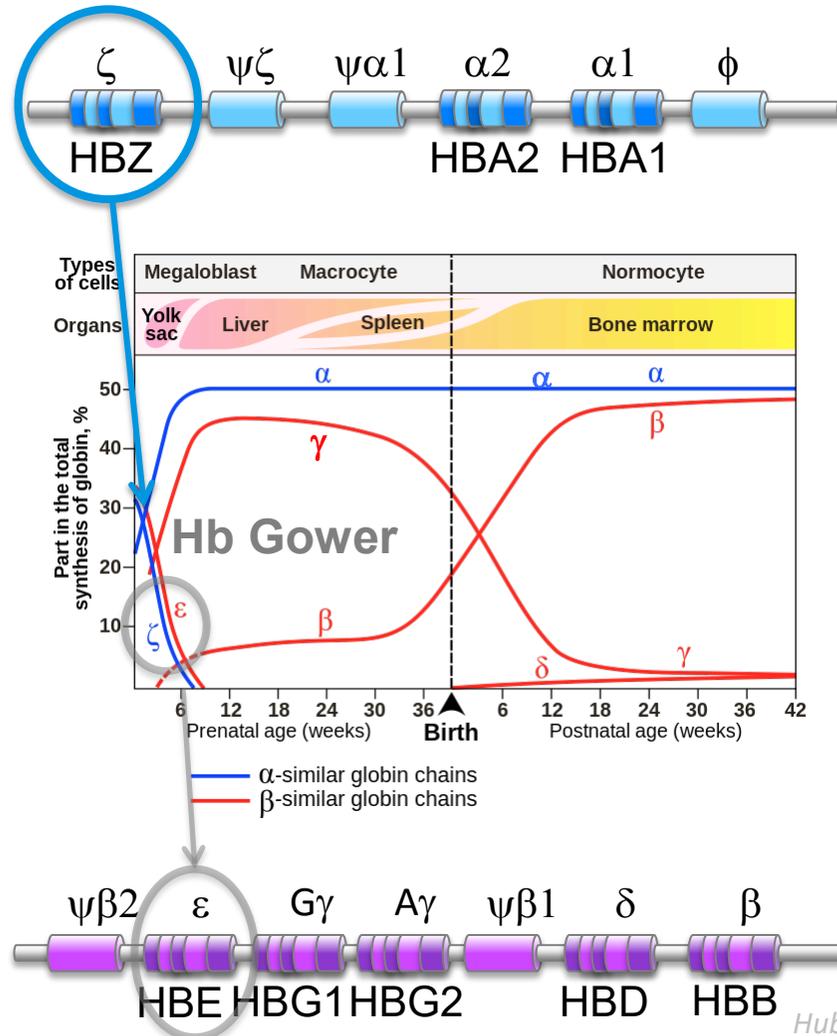


Aufbau des Hämoglobins

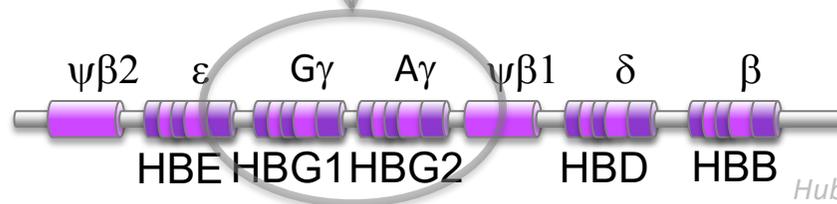
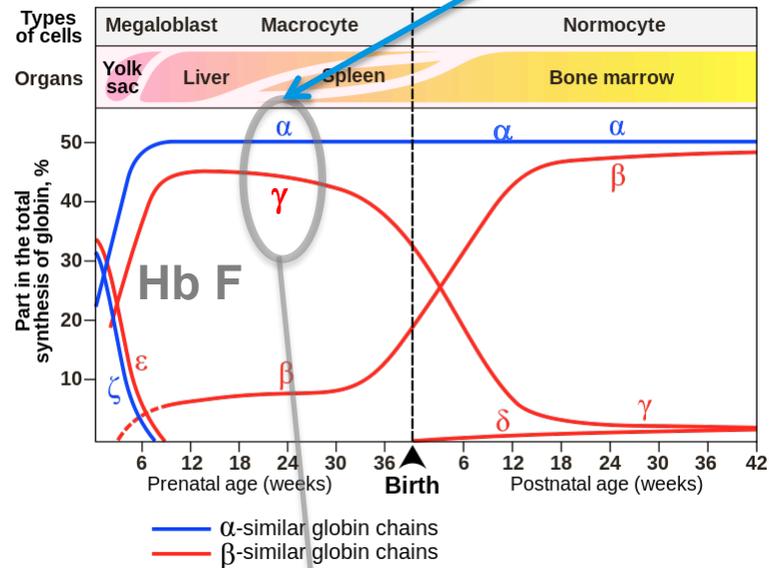
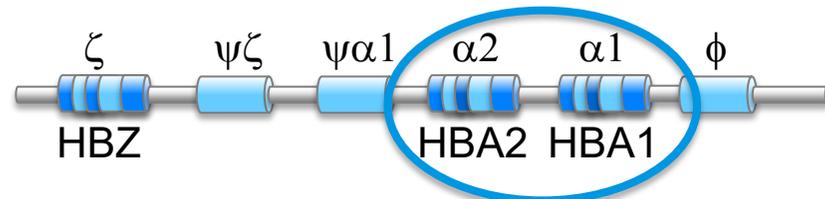


Typ	Ketten	Anteil (%)
Hb A	$\alpha_2 \beta_2$	95 - 96
Hb A ₂	$\alpha_2 \delta_2$	<3.2
Hb F	$\alpha_2 \gamma_2$	<1.5

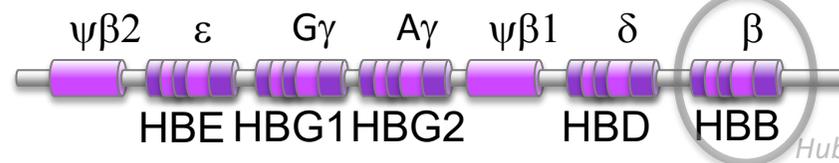
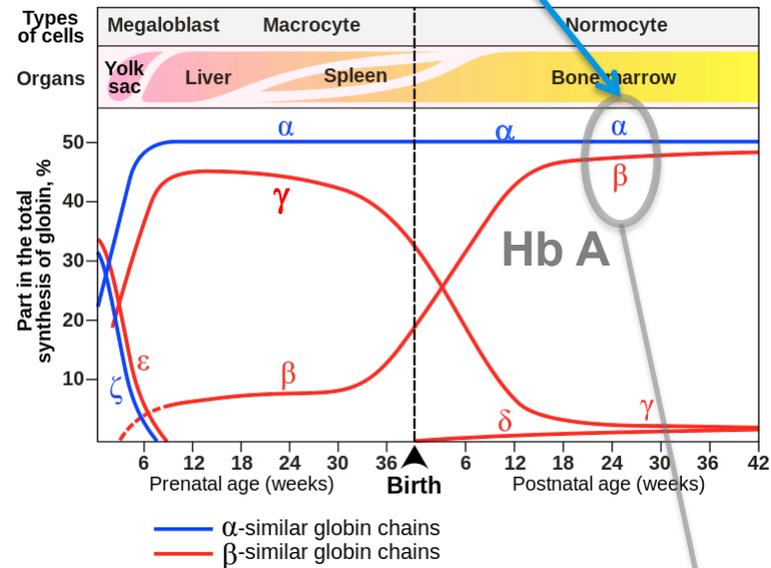
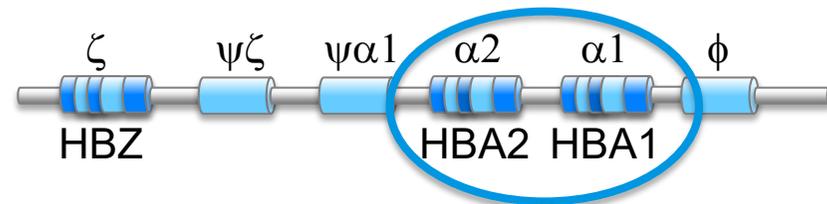
Ontogenese der Hämoglobine



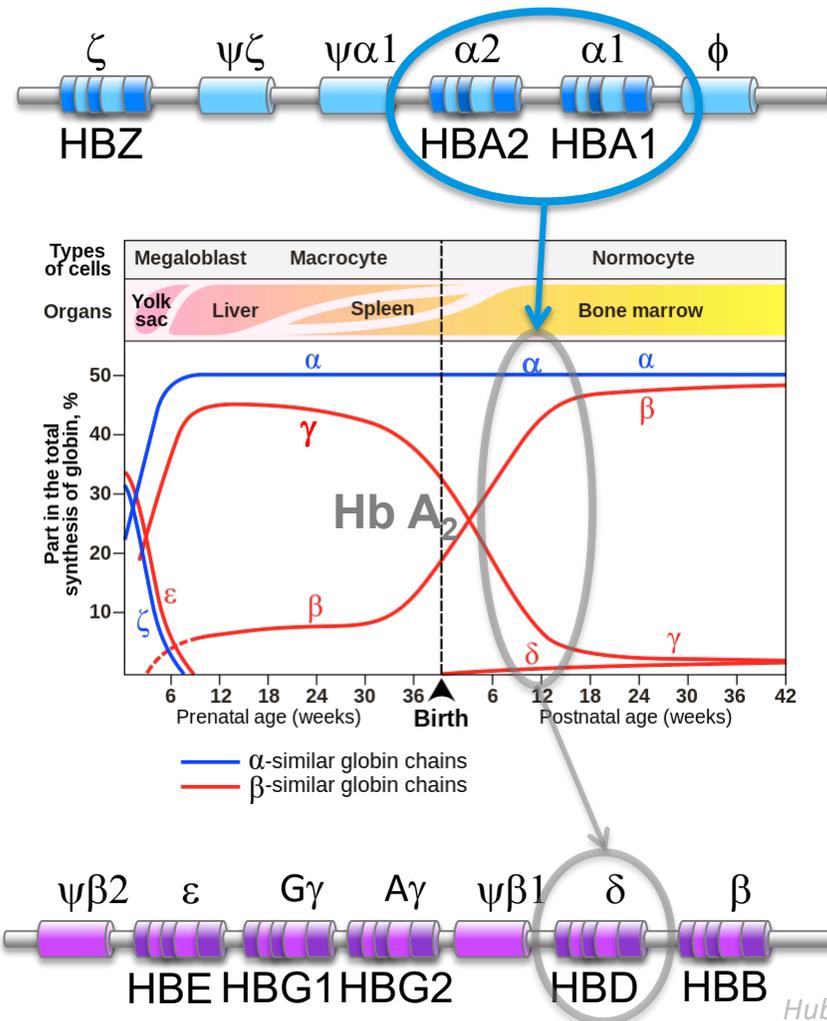
Ontogenese der Hämoglobine



Ontogenese der Hämoglobine

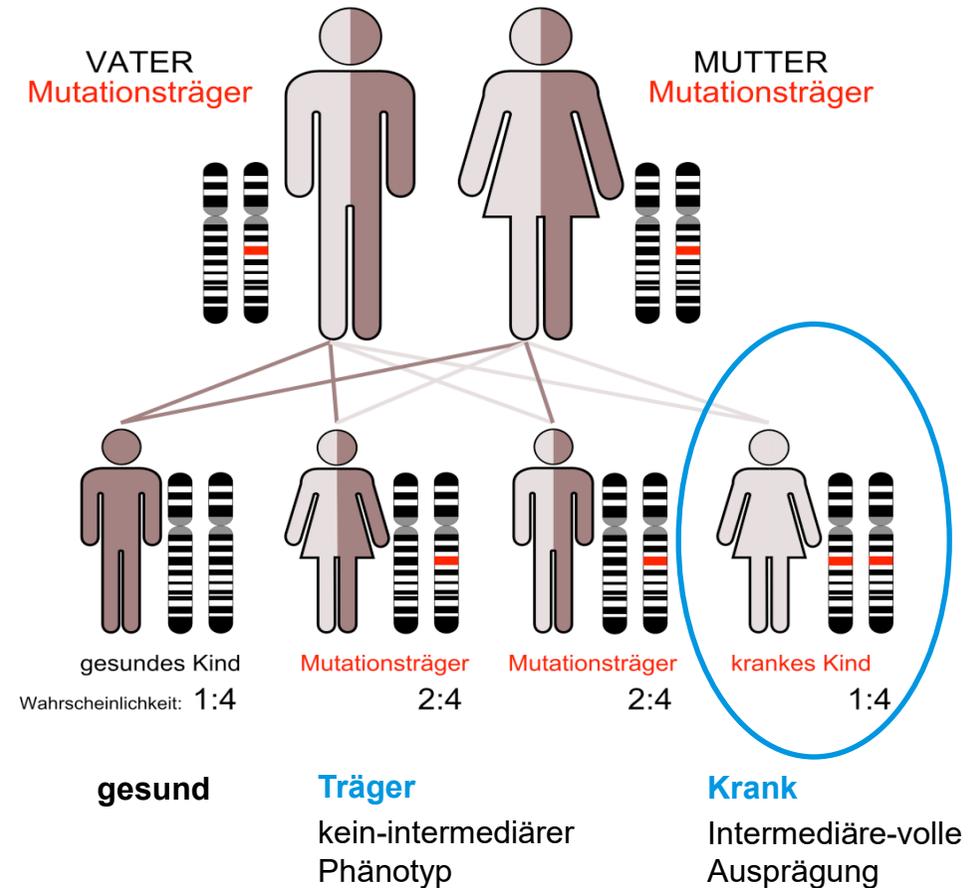


Ontogenese der Hämoglobine

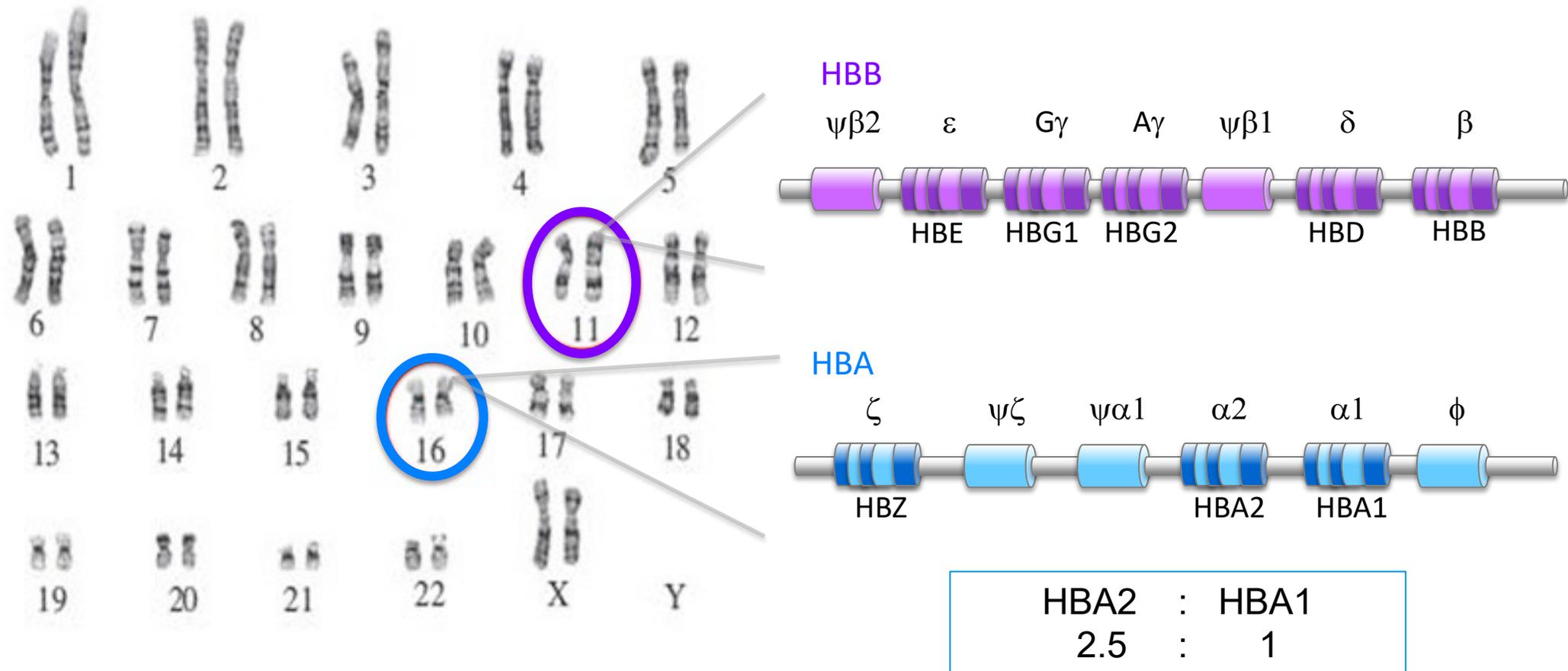


Hämoglobinopathien – genetische Ursache –

- Eine der häufigsten monogenetischen Erbkrankheiten
- (Meist) rezessiv vererbt
- Heterogene Gruppe von genetischen Erkrankungen

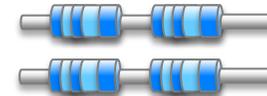


Chromosomale Position der Hb-Gene

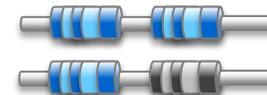


Phänotypische Klassifikation der α -Thalassämien

Gesund, Wildtyp



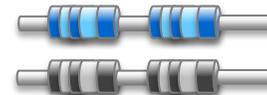
“silent” α -Thalassämie



Unauffällig bis leicht vermindertes Hb, MCV, MCH

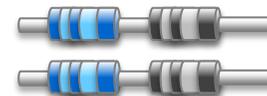
α -Thalassämie Trait

Heterozygot für α^0

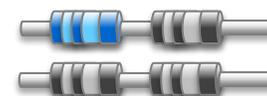


Milde mikrozytäre, hypochrome Anämie

Homozygot für α^+

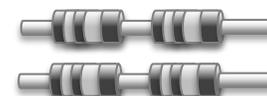


HbH Krankheit



Moderate mikrozytäre, hypochrome Anämie

Hb Bart's Hydrops Fetalis Syndrom (letal)



Schwere mikrozytäre, hypochrome Anämie

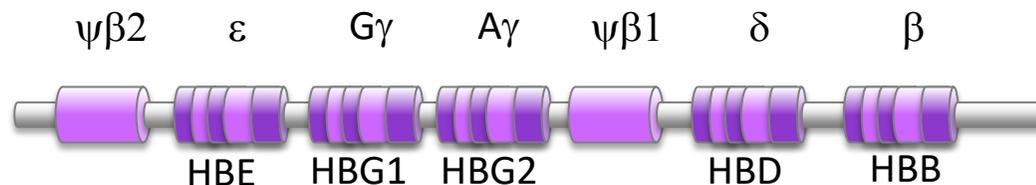
Phänotypische Klassifikation der β – Thalassämien

➤ Defekte β -Globinketten-Synthese oder –Funktion:

Thalassämie – minor → reduzierte Menge

Thalassämie – intermedia

Thalassämie – major → sehr wenig oder keine β -Globinketten



Therapie

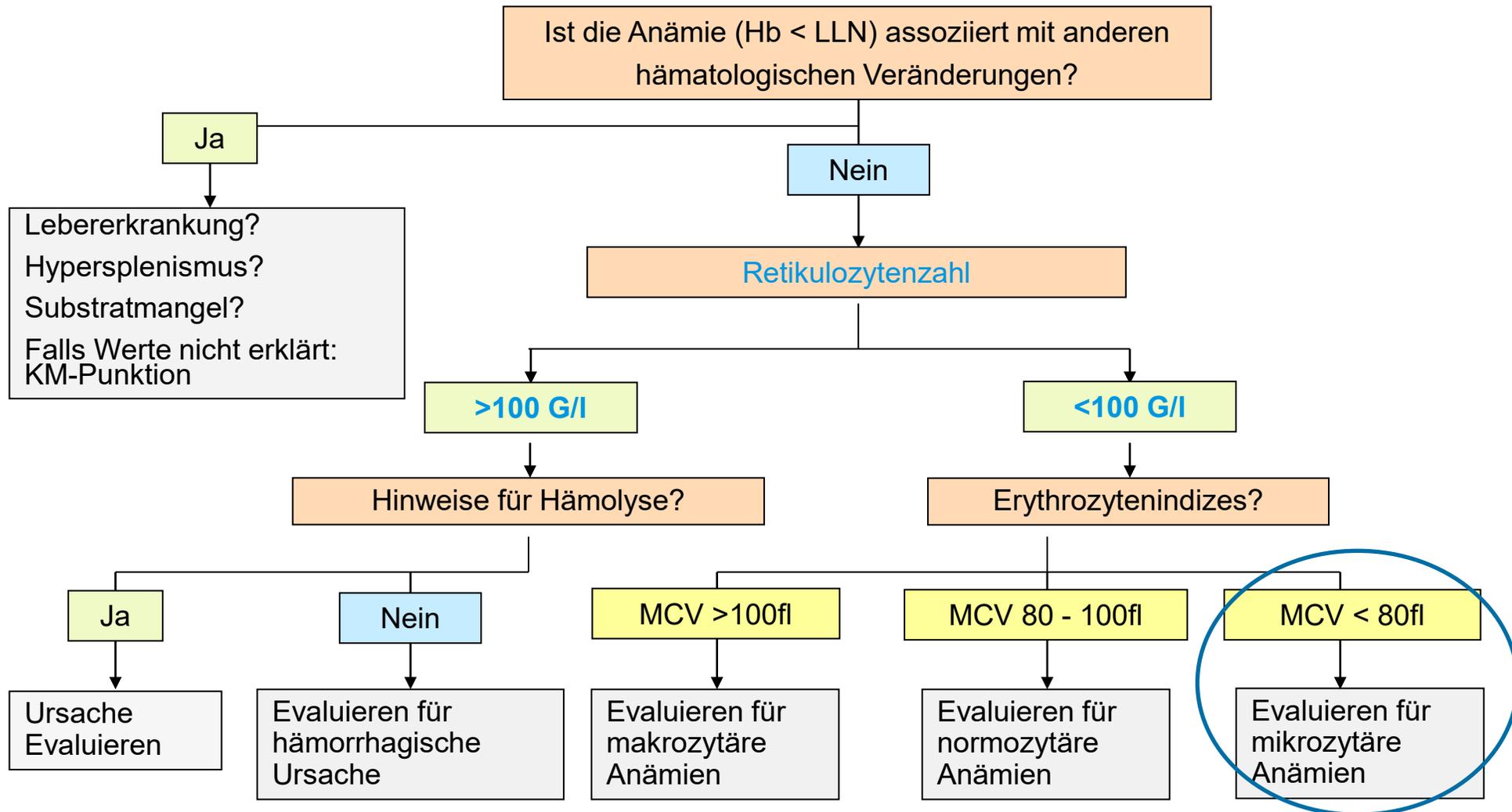
➤ Minorformen

- Meistens keine besondere Behandlung notwendig
- Kein Eisen!! Ausser bei nachgewiesenem Eisenmangel

➤ Majorformen

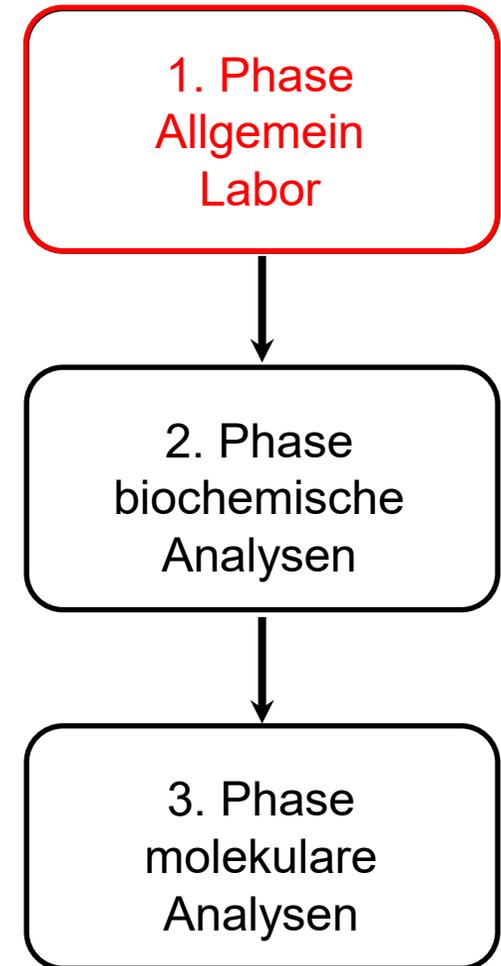
- Sehr aufwendig
- EC-Transfusionen in Kombination mit Eisenmobilisation
- Splenektomie
- Allogene Stammzelltransplantation

Diagnostischer Algorithmus der Anämien



Diagnostischer Algorithmus

- Blutbildparameter / Hämogramm
- Blutausstrich
- Retikulozytenzahl
- Eisenstatus
- Entzündungsparameter
- Hämolyseparameter
- Zinkprotoporphyrin



Huber-Herklotz-Formel

Ziel: Erleichterte Differenzierung von Thalassämien und Eisenmangel-Anämien

Messwerte

- **MCH** (mittlerer korpuskulärer Hb-Gehalt)
- **MCV** (mittleres korpuskuläres Volumen)
- **MCHC** (mittlere korpuskuläre Hb-Konzentration)
- **Hb** (Hämoglobin)
- **Hkt** (Hämatokrit)
- **Ec** (Erythrozyten)
- **RDW** (Erythrozytenverteilungsbreite)

$$HH = \frac{MCH * RDW}{10 * EC} + RDW$$

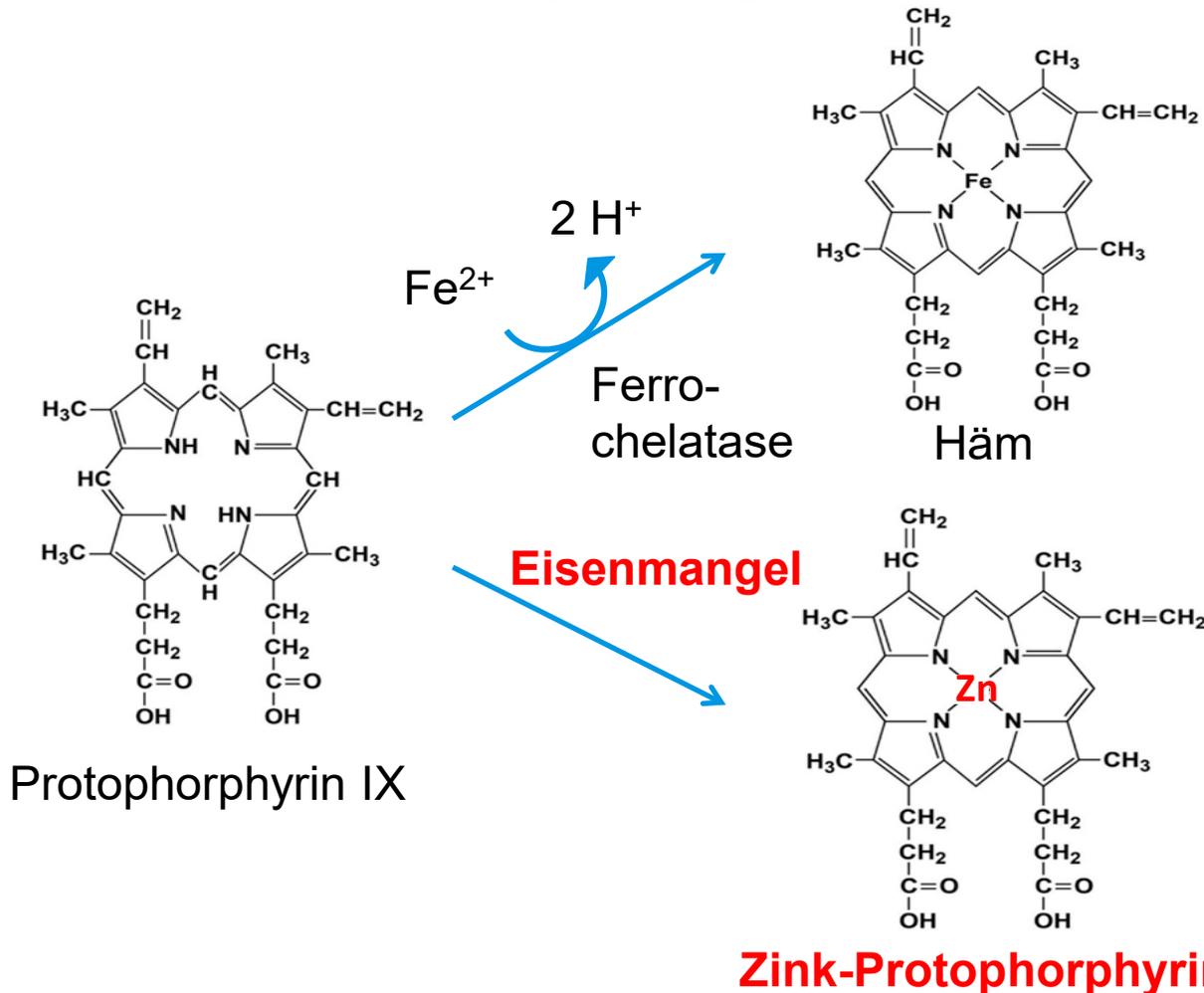
Eisenmangel > 23

Graubereich 21-23

Thalassämie < 21

Eisenmessung: Zink-Protoporphyrin-Messung

Ziel: Hinweis auf Eisenmangel-bedingte Anämie

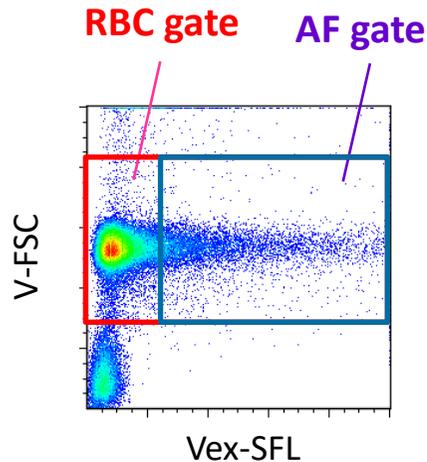


Erhöhte Werte:

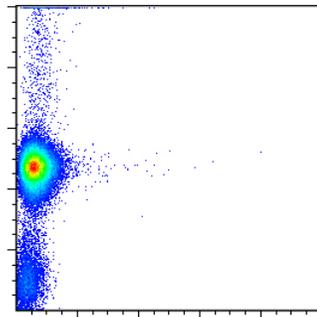
- Eisenmangel
- Bleivergiftung
- MDS
- Anämie bei chronischen Erkrankungen

Blue Laser Technology von Sysmex™

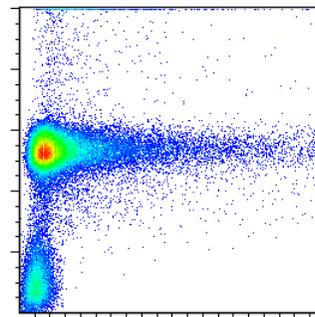
➤ «erythrocyte auto-flourescence rate» = AF



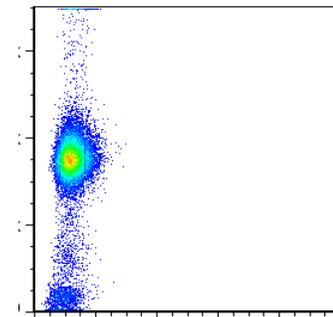
$$\text{Autofluorescence-rate (AF\%)} = \frac{\text{Cell number in AF gate}}{\text{Cell number in RBC gate}} \times 100$$



Keine Anämie

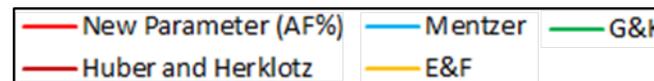
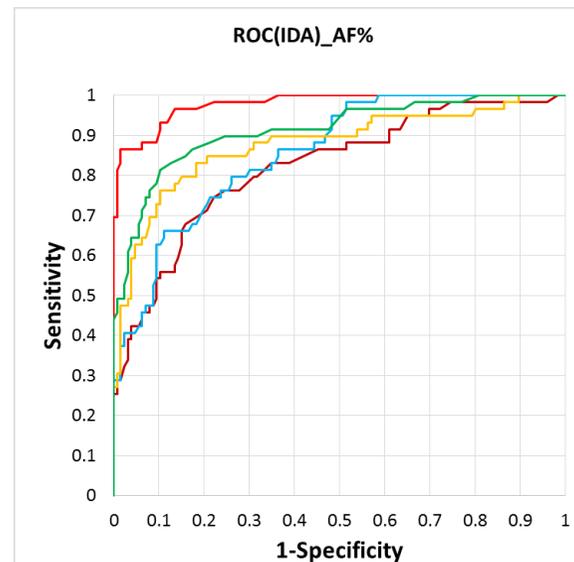
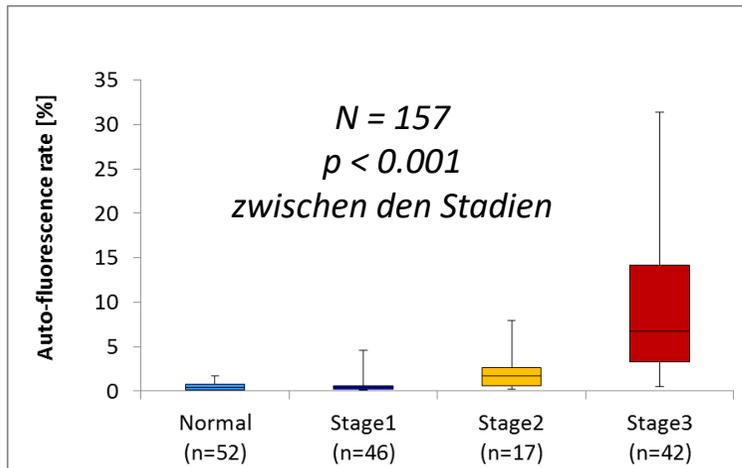


Eisenmangel



β-Thalassämie

Diagnostische Performance für α/β -Thalassämien vs. Eisenmangel

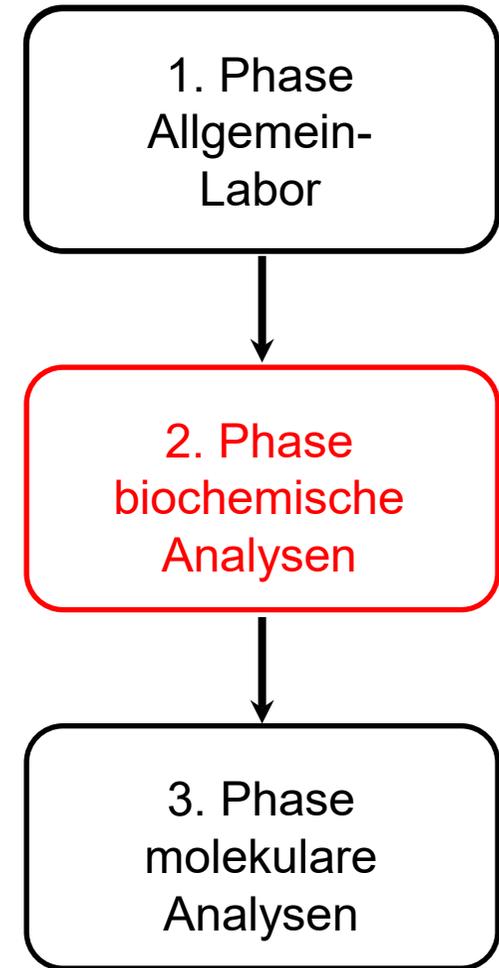
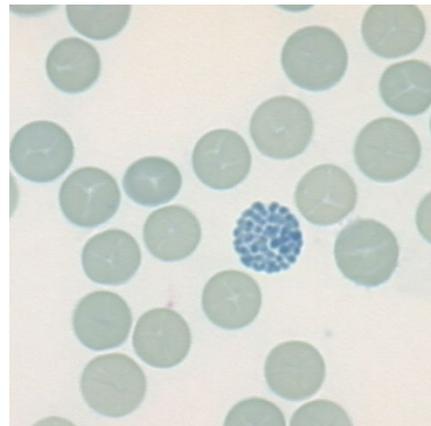
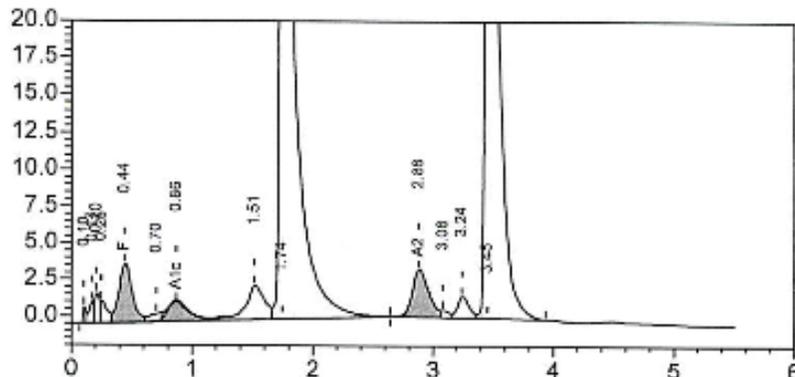


Formula	AUC
New parameter(F%)	0.978*
G&K	0.913*
E&F	0.877
Mentzer	0.856
Huber and Herklotz	0.822

**p = 0.005
für AF% vs. G&K*

Diagnostischer Algorithmus

- Klinische Informationen
- Andere Informationen (FA, Ethnie, Transfusionen, SS)
- Hämoglobinstabilität



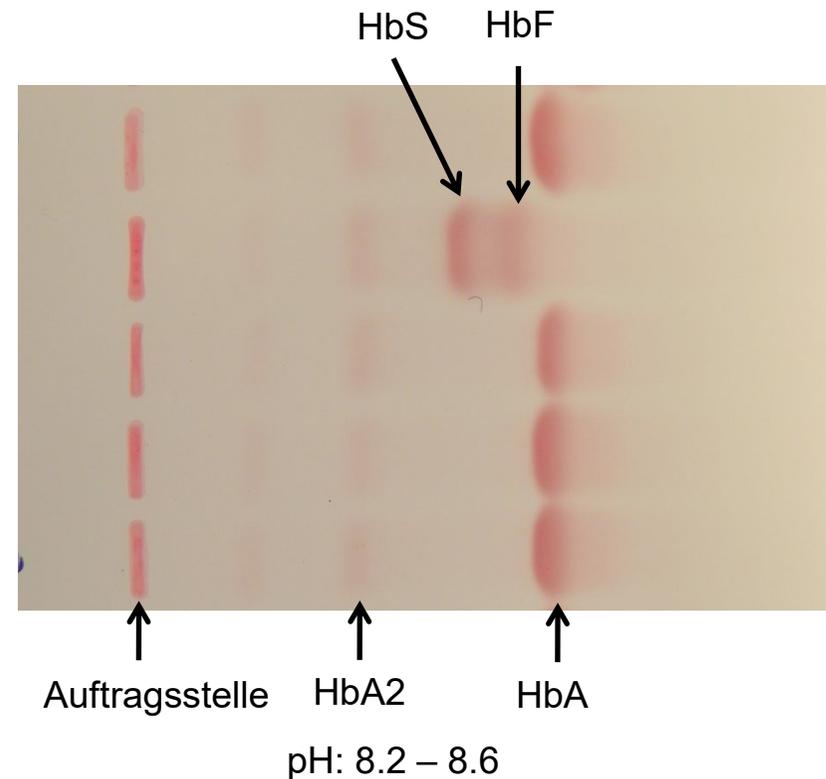
Identifikation der Hämoglobin-Fraktionen

Methoden

- **CAF** (Celluloseacetatfolien-Elektrophorese)
- **HPLC** (High performance liquid chromatography)
- **CE** (Kapillarelektrophorese)

Krankheit	Auftragsstelle	HbA ₂	HbS	HbF	HbA	HbH
normal oder α -Thalassämie*		orange			orange	
heterozygotes HbS		orange	orange		orange	
homozygotes HbS (Sichelzellkrankheit)		orange	orange		orange	
heterozygote β -Thalassämie (Thalassaemia minor)		orange		orange	orange	
homozygote β^0 -Thalassämie (Thalassaemia major)		orange		orange		
compound Heterozygotie von HbS mit einer β^0 -Thalassämie		orange	orange		orange	
compound Heterozygotie von HbS mit HbC		orange	orange		orange	
HbH-Krankheit		orange			orange	orange

* ausgenommen: HbH-Krankheit und Hb Bart's Hydrops fetalis

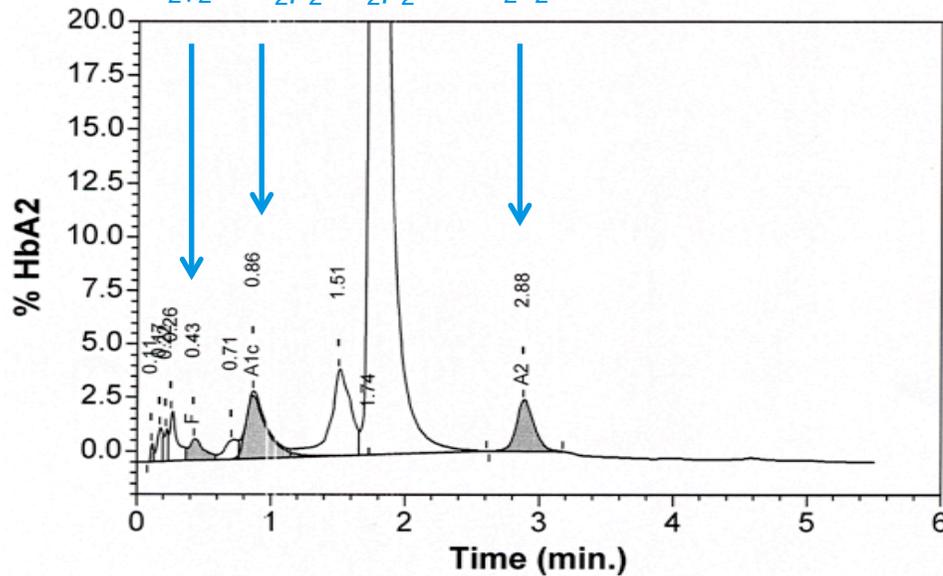


Identifikation der Hämoglobin-Fraktionen

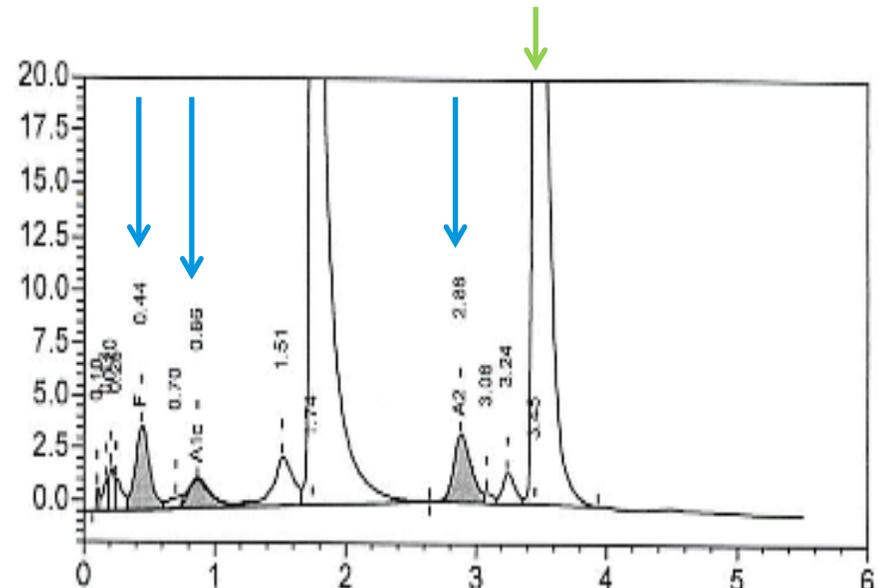
Methoden

- **CAF** (Celluloseacetatfolien-Elektrophorese)
- **HPLC** (High performance liquid chromatography)
- **CE** (Kapillarelektrophorese)

Gesunder HbF HbA HbA HbA₂
 $\alpha_2\gamma_2$ $\alpha_2\beta_2$ $\alpha_2\beta_2$ $\alpha_2\delta_2$



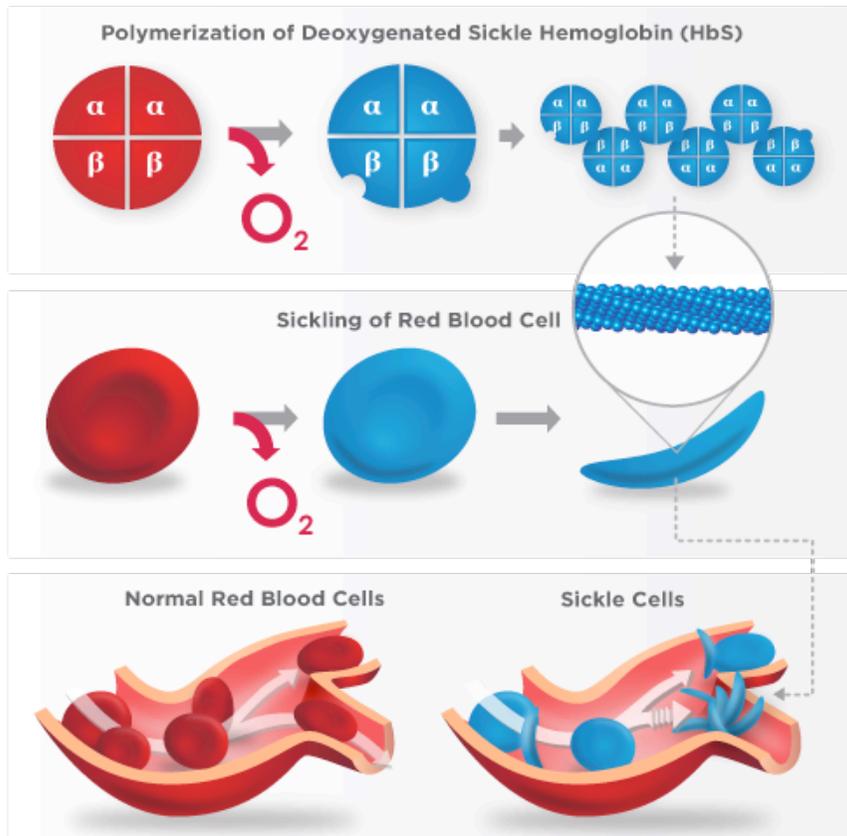
Hb AS HbF HbA HbA HbA₂ HbS



Hb S: Sichelzellttest

Ziel: Komplementäre hämatologische Methode zur Bestätigung der Hb S-Diagnose

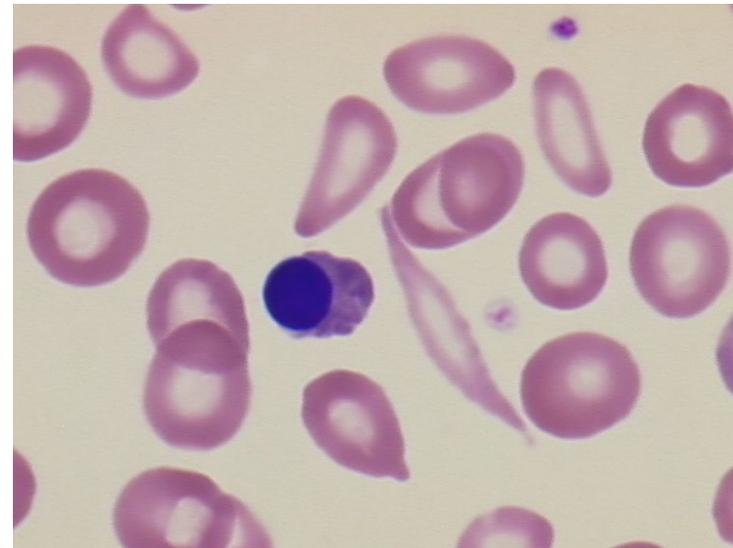
Mechanism of Sickle Cell Disease



«Sicheln» der desoxygenierten Sichelzellen

→ Blutausstrich unter O_2 -Entzug: Induktion des Sichelns

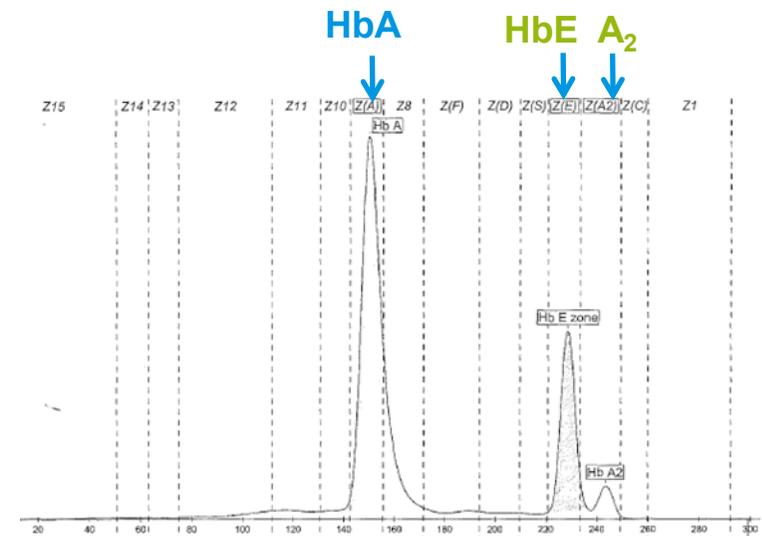
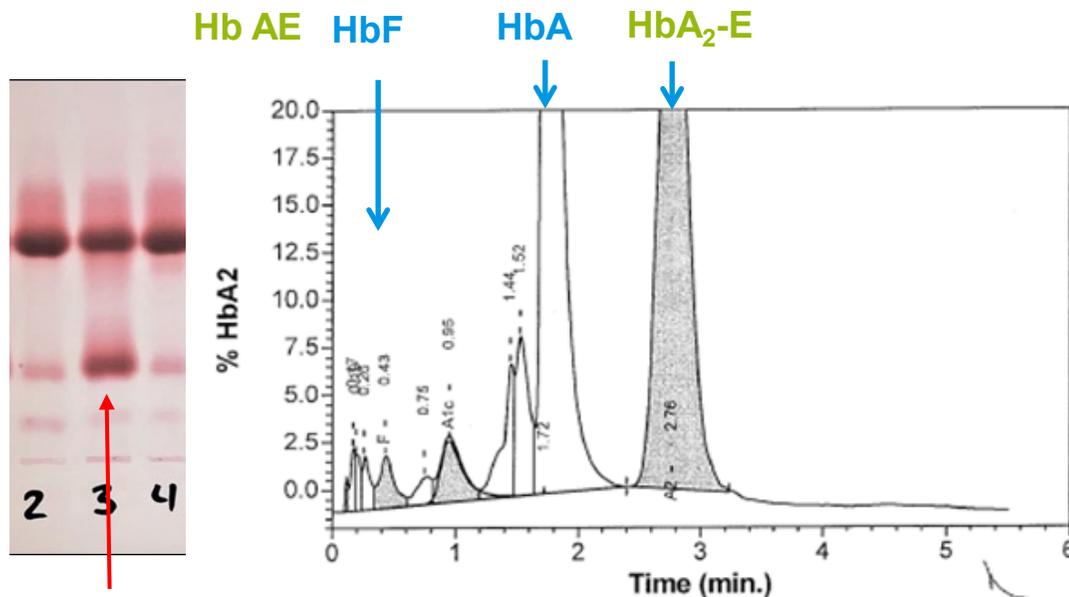
- Polymerisierung des Hb S
- Verformung des Erythrozyten (Sichelzelle)
- Duktilitätsverlust



Identifikation der Hämoglobin-Fraktionen

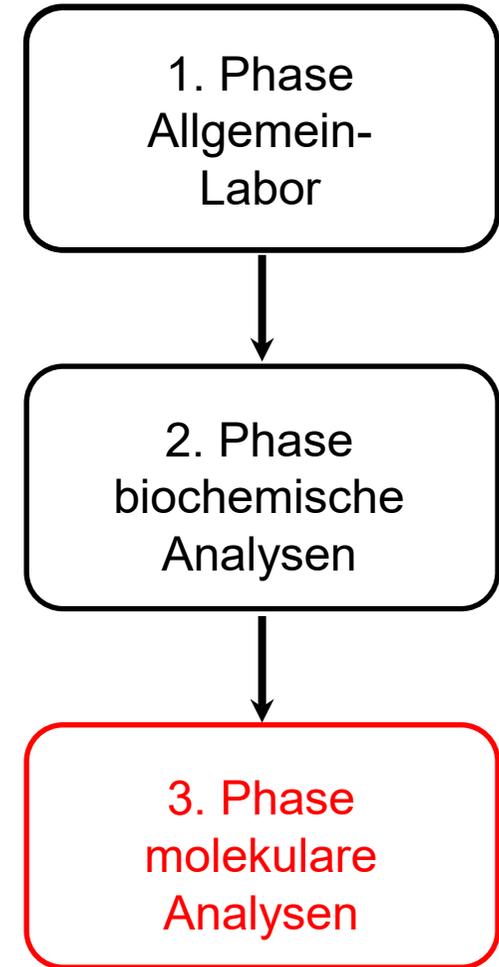
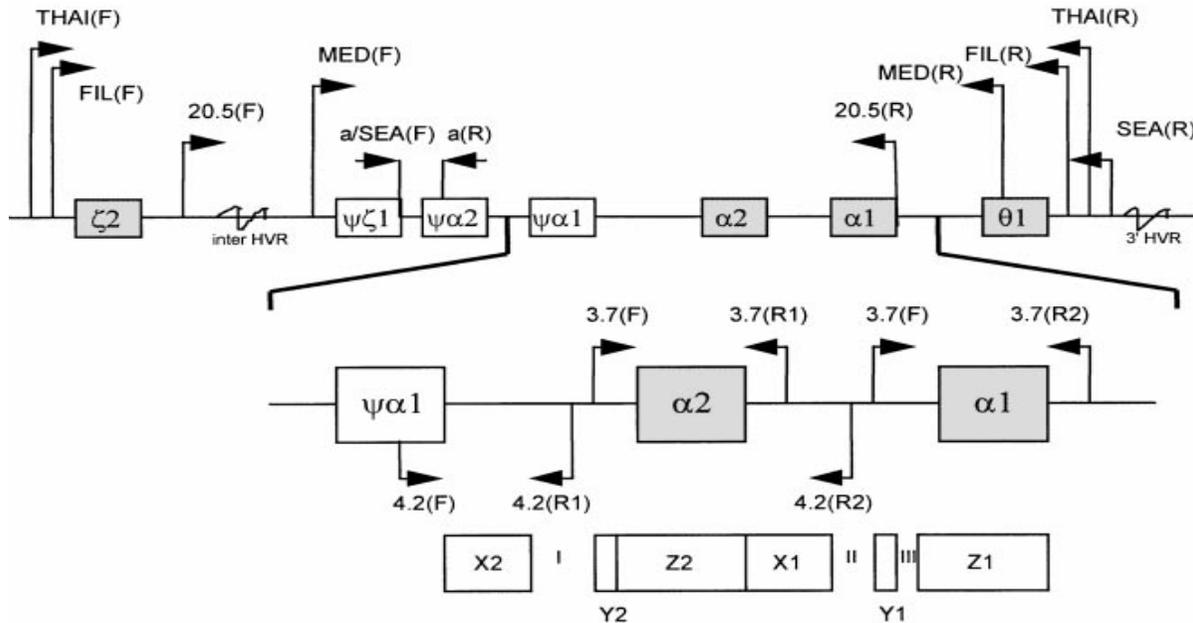
Methoden

- **CAF** (Celluloseacetatfolien-Elektrophorese)
- **HPLC** (High performance liquid chromatography)
- **CE** (Kapillarelektrophorese)



HbE heterozygot

Diagnostischer Algorithmus



Deletionsanalyse

GAP-PCR (Polymerase Chain Reaction)

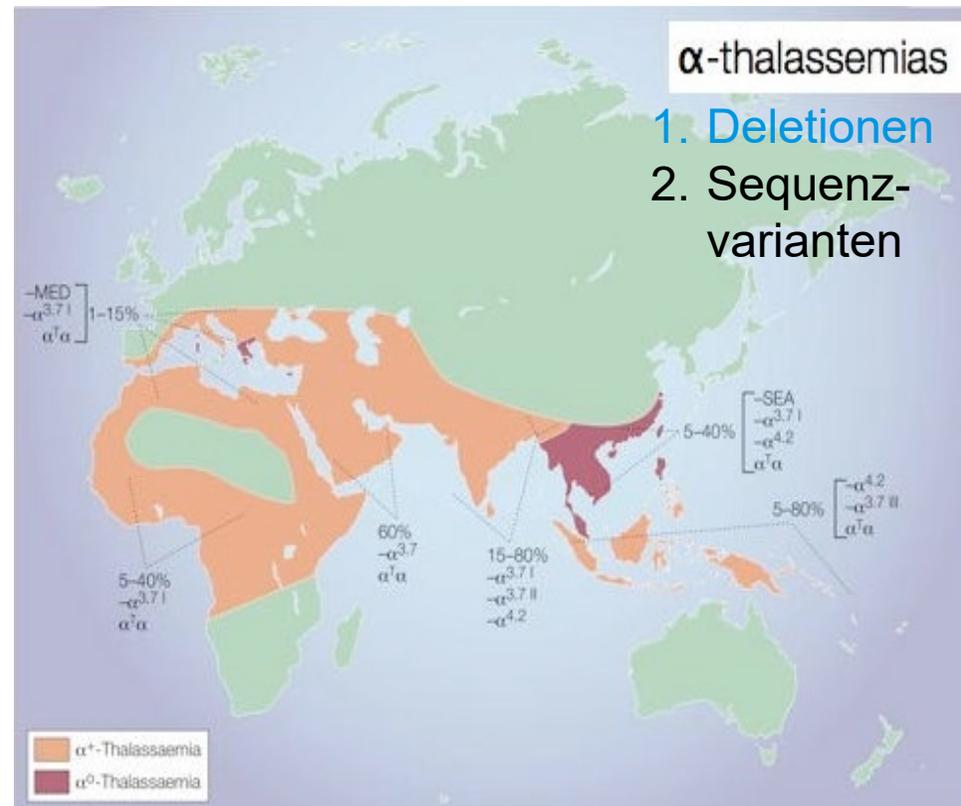
Anwendung:

- Häufigste α -Globingencluster-Deletionen
 - α^+ ($-\alpha^{3.7\text{kb}}$, $-\alpha^{4.2\text{kb}}$)
 - α^0 ($-\text{SEA}$, $-\text{MED}$, $-\text{THAI}$, $-(\alpha)^{20.5\text{kb}}$, $-\text{FIL}$)
- spezifische HPFH-Typen, δ/β -Thalassämien

MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification)

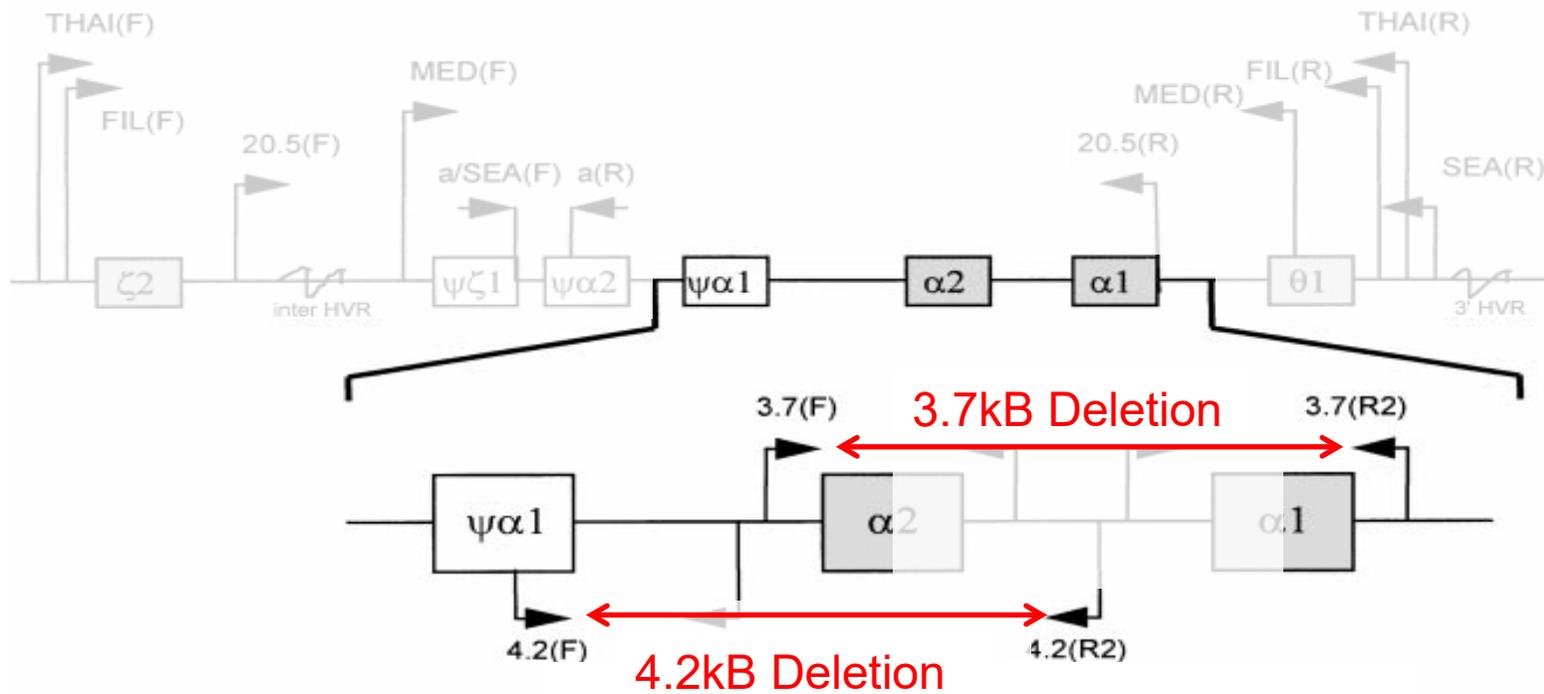
Anwendung: α - und β -Thalassämien

- Komplexere Deletionen



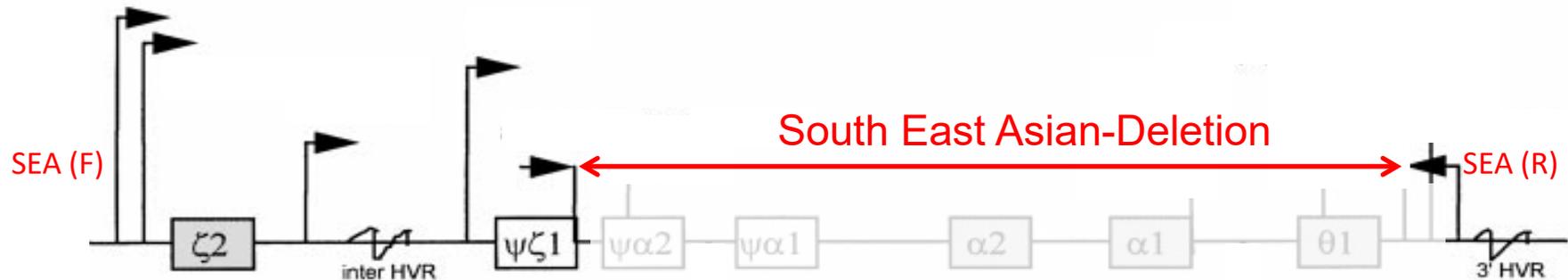
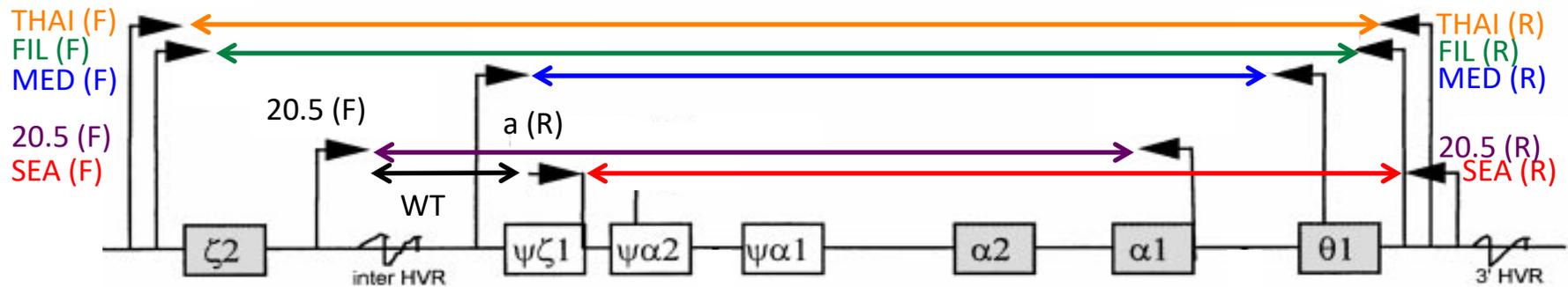
Deletionsanalyse: GAP-PCR

Bsp: α^+ -Thalassämie



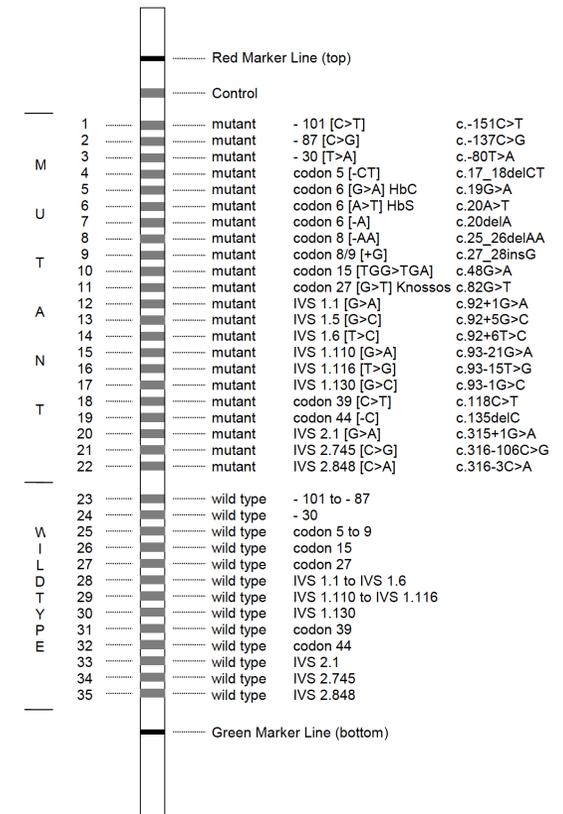
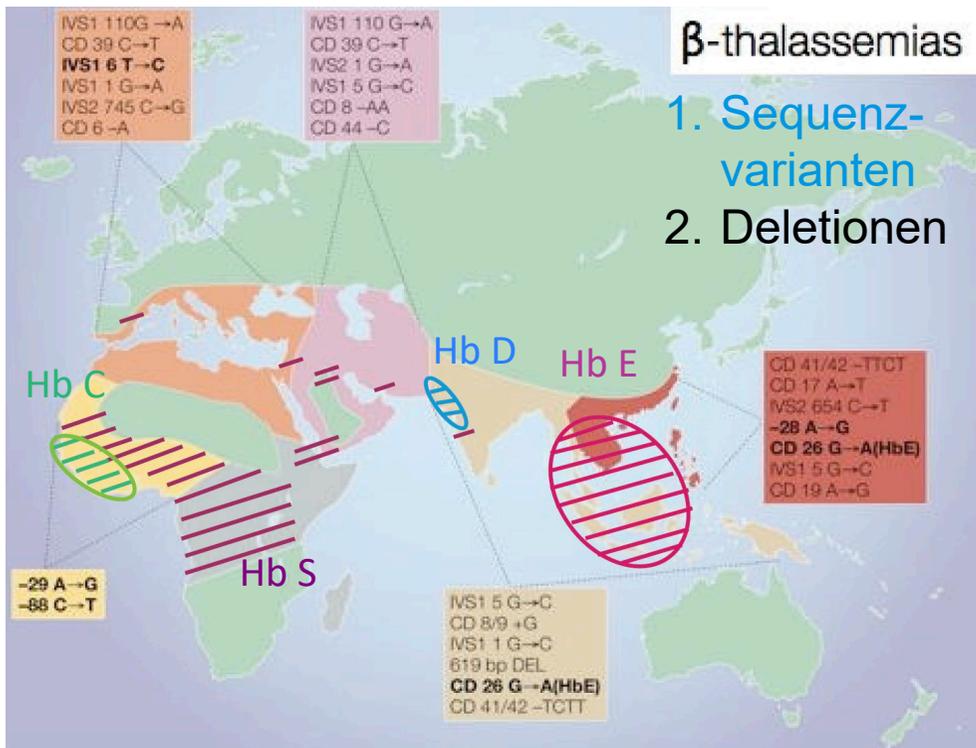
Deletionsanalyse: GAP-PCR

Bsp: α^0 -Thalassämie



Sequenzvarianten: Beta-Strip

Ziel: Bestimmung der 22 häufigsten Sequenzvarianten des β -Globingens



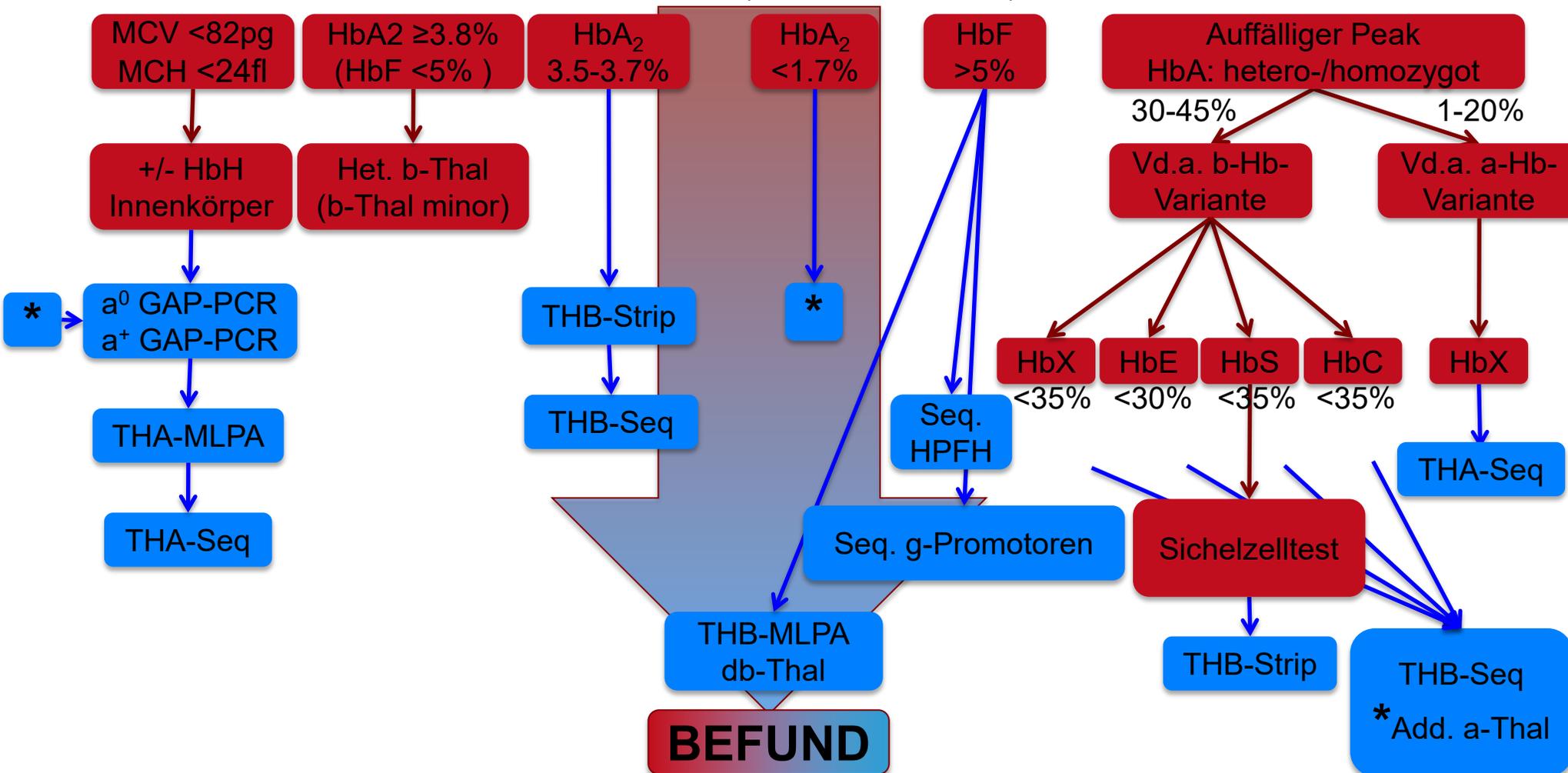
Sequenzvarianten: Sequenzierung

Ziel: Bestimmung patientenspezifischer DNA-Sequenzvarianten in α - & β - Globingenen



Sequentielle Diagnostik: Workflow

- Familienanamnese
- klinische Angaben/Anforderungen
- HH-Formel < 21 (Graubereich 21-23)



Fallbeispiel

Fallbeispiel

- 33 jährige Patientin stammt aus Damaskus (Syrien)
- Bekannte microzytäre, hypochrome Anämie
- Intermittierende Ikterus
- Wiederholte Transfusionen während den Schwangerschaften
- Leichte Hepato-Splenomegalie
- Zurzeit asymptomatisch

Parameter	Normbereich	A.O.
Hämoglobin	120 – 155 g/l	95
Hämatokrit	0.36 – 0.45 l/l	0.346
Erythrozyten	3.9 – 5.6 T/l	5.24
MCV	80 – 98 fl	66
MCH	27 – 34 pg	18.1
MCHC	310 – 360 g/l	275
Ec-Anisocytose (RDW-CV)	< 15 %	19.7

Fallbeispiel

Frage 1

Welche Untersuchungen würden Sie als nächstes veranlassen

1. Ferritin
2. Leberparameter (ALAT)
3. Entzündungsparameter (CRP)
4. Zinkprotoporphyrin
5. Thalassämie / Hämoglobinopathie Abklärung
6. Hämolyseparameter
7. Antwort 1 & 4
8. Alles (1-6)
9. Stufendiagnostik: zuerst Eisenmangel ausschliessen, danach Thalassämie / Hämoglobinopathie Abklärung

Fallbeispiel

Frage 1

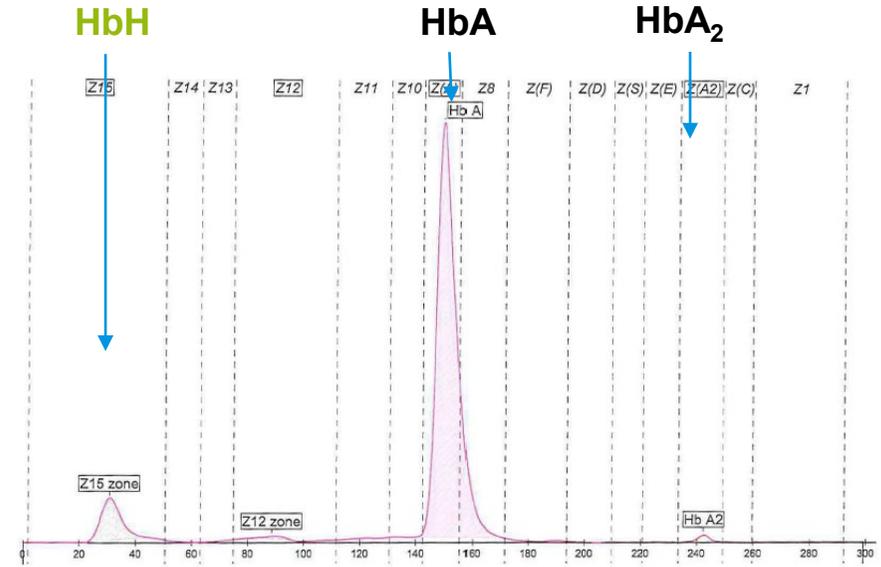
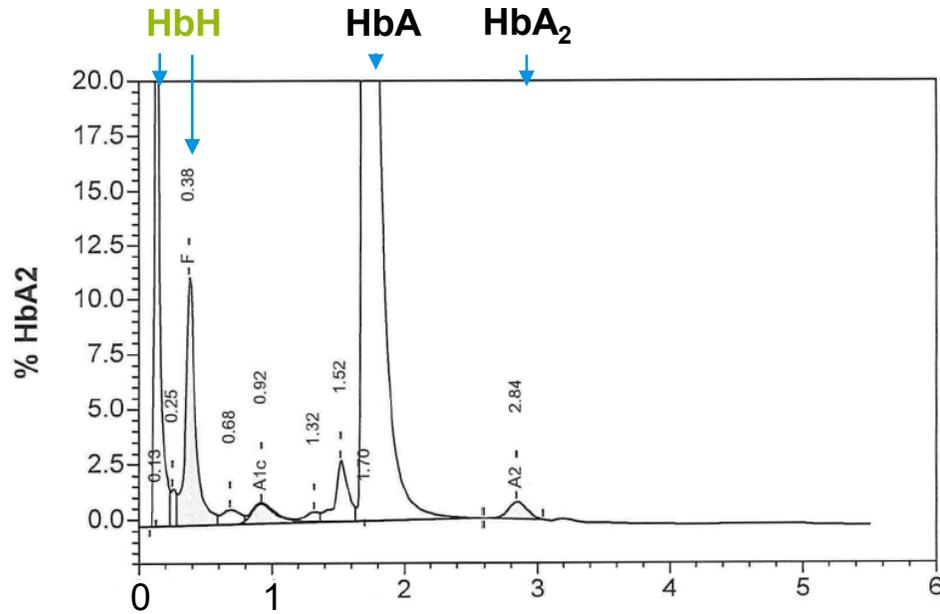
Welche Untersuchungen würden Sie als nächstes veranlassen

1. Ferritin
2. Leberparameter (ALAT)
3. Entzündungsparameter (CRP)
4. Zinkprotoporphyrin
5. Thalassämie / Hämoglobinopathie Abklärung
6. Hämolyseparameter
7. Antwort 1 & 4
8. Alles (1-6)
9. Stufendiagnostik: zuerst Eisenmangel ausschliessen, danach Thalassämie / Hämoglobinopathie Abklärung

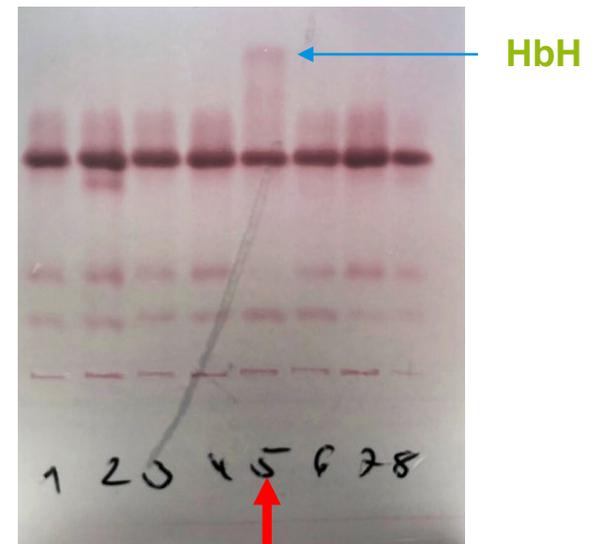
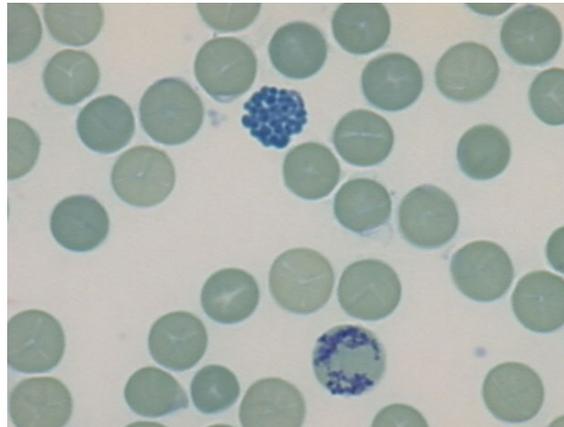
Befunde

Analyse	Einheit	Normwerte	20.01.2022
Ferritin	µg/l	23 – 110	57
CRP	mg/dl	<0.6	<0.1
Tf-Sättigung	%	16 – 45	30
Tf-Rezeptor – lösl.	mg/l	1.71 – 4.13	12.37
Retikulozyten	%	0.54 – 2.02	3.72
Retikulozyten abs.	G/l	25 – 102	192
ALAT	U/l	<35	20
Zinkprotoporphyrin	Umol/mol Häm	<50	67

Fallbeispiel



Typ	Anteil (%)
HbH	18.7
HbF	<0.5
HbA ₂	0.8



Fallbeispiel

Frage 2

Ihre Verdachtsdiagnose lautet:

1. β - Thalassämia minor
2. β - Thalassämia major
3. α – Thalassämia minima (heterozygote α^+ Thalassämie)
4. HbH-Krankheit (compound heterozygot)
5. α – Thalassämia minor (homozygote α^+ Thalassämie)

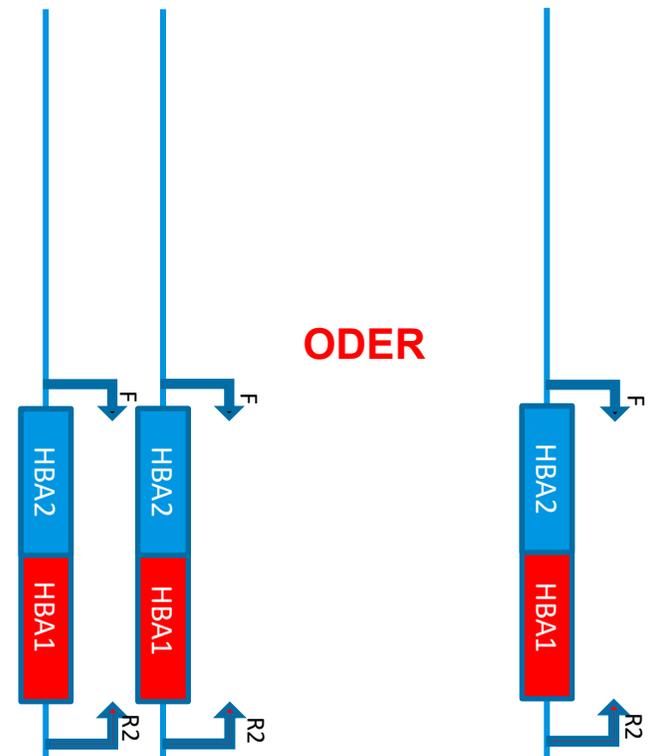
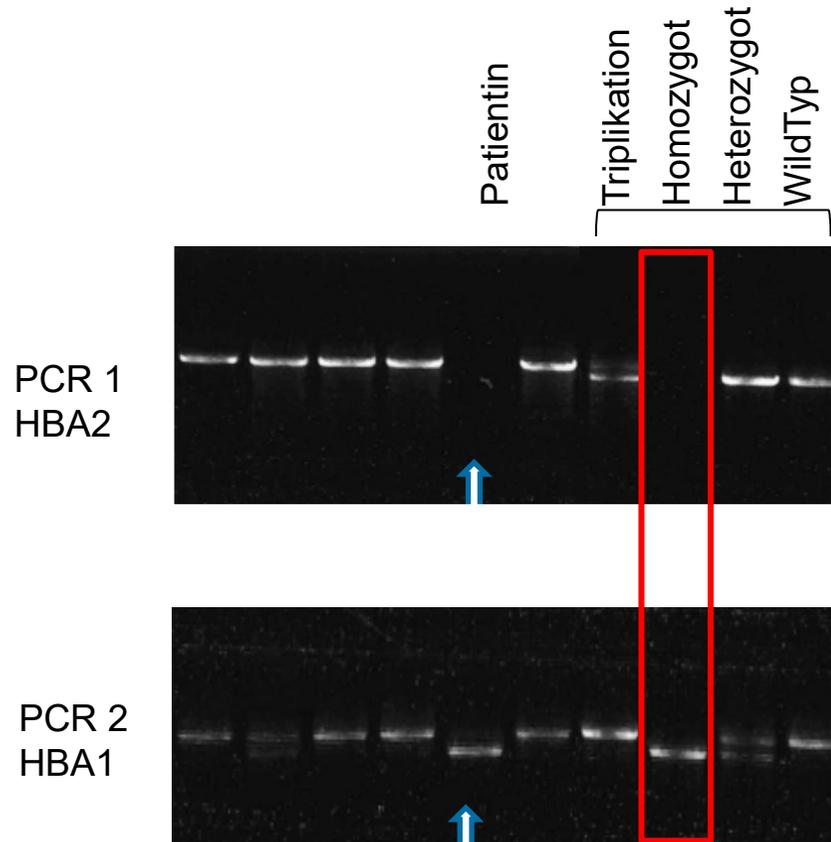
Fallbeispiel

Frage 2

Ihre Verdachtsdiagnose lautet:

1. β - Thalassämia minor
2. β - Thalassämia major
3. α – Thalassämia minima (heterozygote α^+ Thalassämie)
4. HbH-Krankheit (compound heterozygot)
5. α – Thalassämia minor (homozygote α^+ Thalassämie)

Fallbeispiel Genetik – GAP PCR –



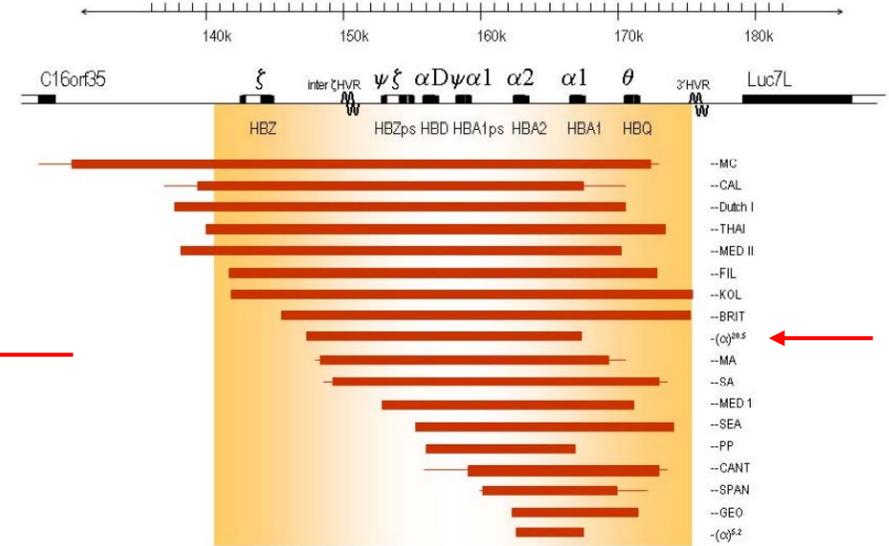
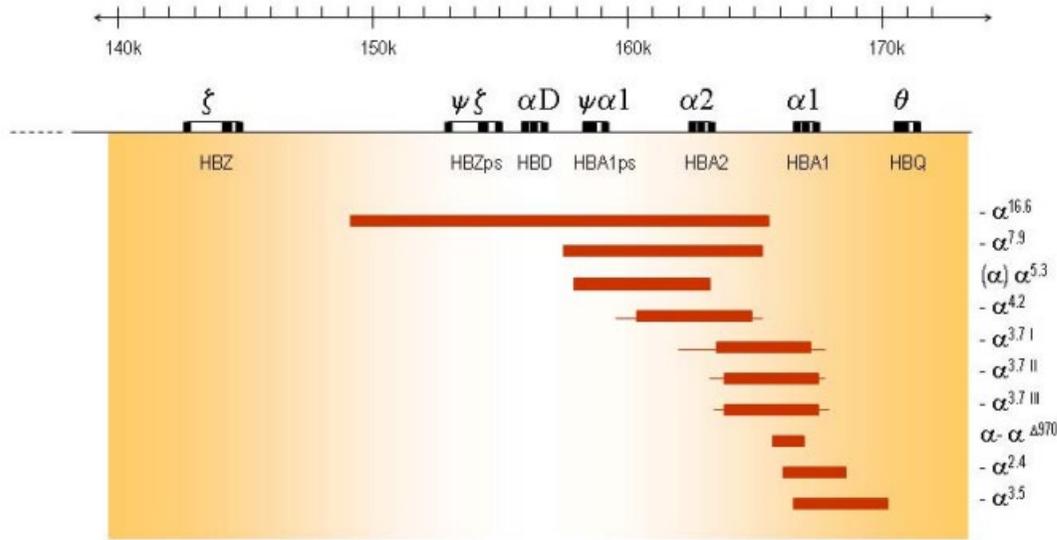
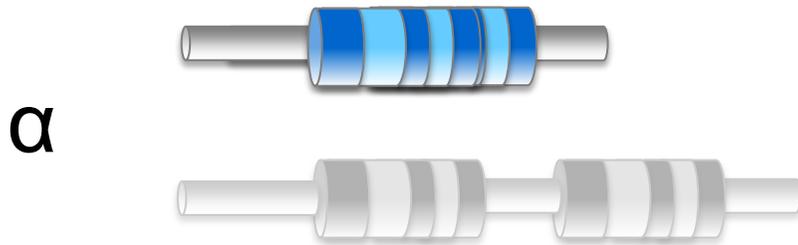
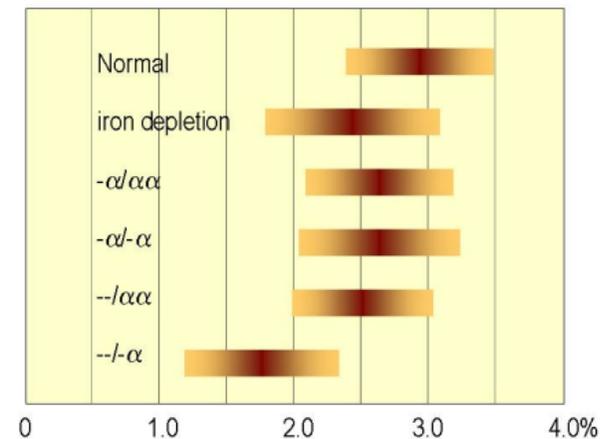


Figure 5 Deletions of one α -gene giving rise to α^+ -thalassaemia. The extent of the deletion is shown as bars, thin lines indicate regions of uncertainty of the breakpoints.

Figure 6 Deletions of two α -genes giving rise to α^0 -thalassaemia.



Haemoglobin A₂ levels in different α -thal genotypes



HbH Erkrankung – Review –

- Häufig compound Heterozygotie
- Selten homozygot für einen moderat-schweren genetischen Defekt ($\alpha^T\alpha / \alpha^T\alpha$)
- Normalerweise werden <30% alpha-Globin Ketten synthetisiert
- Klinisch äussert sich mit
 - Splenomegalie (schwere Formen)
 - Hypersplenismus
 - Ikterus
 - Folsäuremangel
- Komplikationen
 - Infektionen
 - Ulkus
 - Gallensteine
- Patienten mit non-Deletionalen HbH sind klinisch schwerer betroffen
- Eisenüberladung (CAVE: ältere Patienten)

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit



Fragen?