

Institut für Labormedizin

# Moderne Analytik der Hämoglobinopathien & Thalassämien



**Dr. med. Adriana Méndez**

Leitende Ärztin

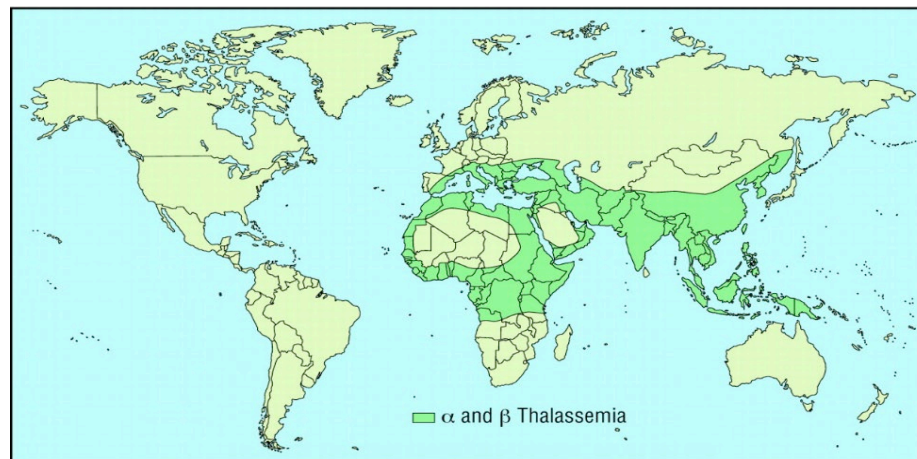
Institut für Labormedizin, Kantonsspital Aarau

# 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



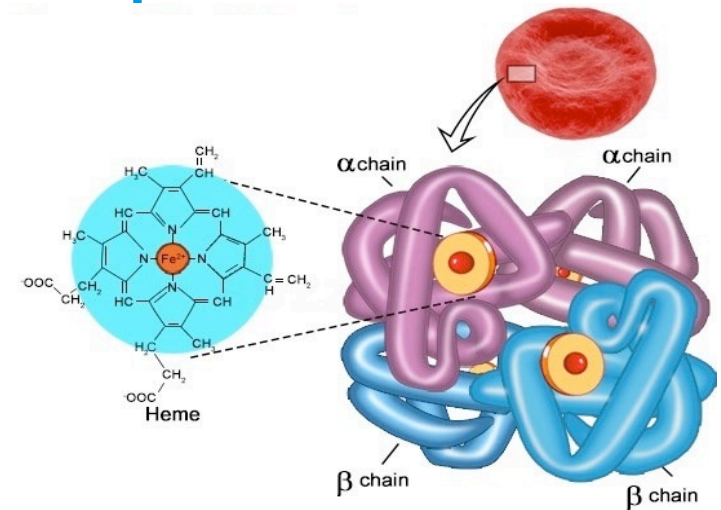
# Klassifikation der Hämoglobinopathien

## Abnormales Hämoglobin

Qualitative strukturelle Veränderung des Hämoglobins

## Thalassämie

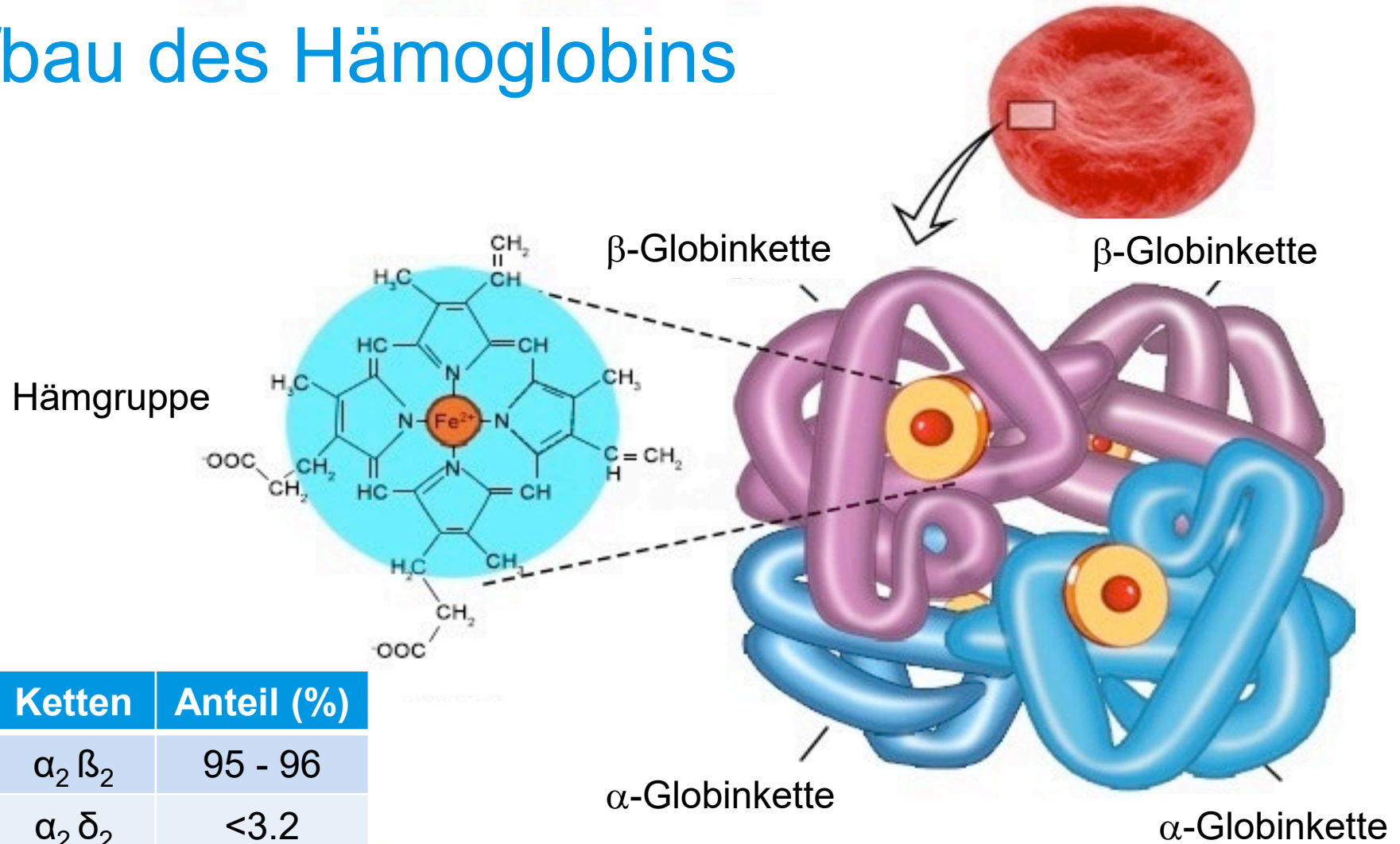
Quantitative Veränderung der Hämoglobinsynthese



## Auftreten der Mutationen

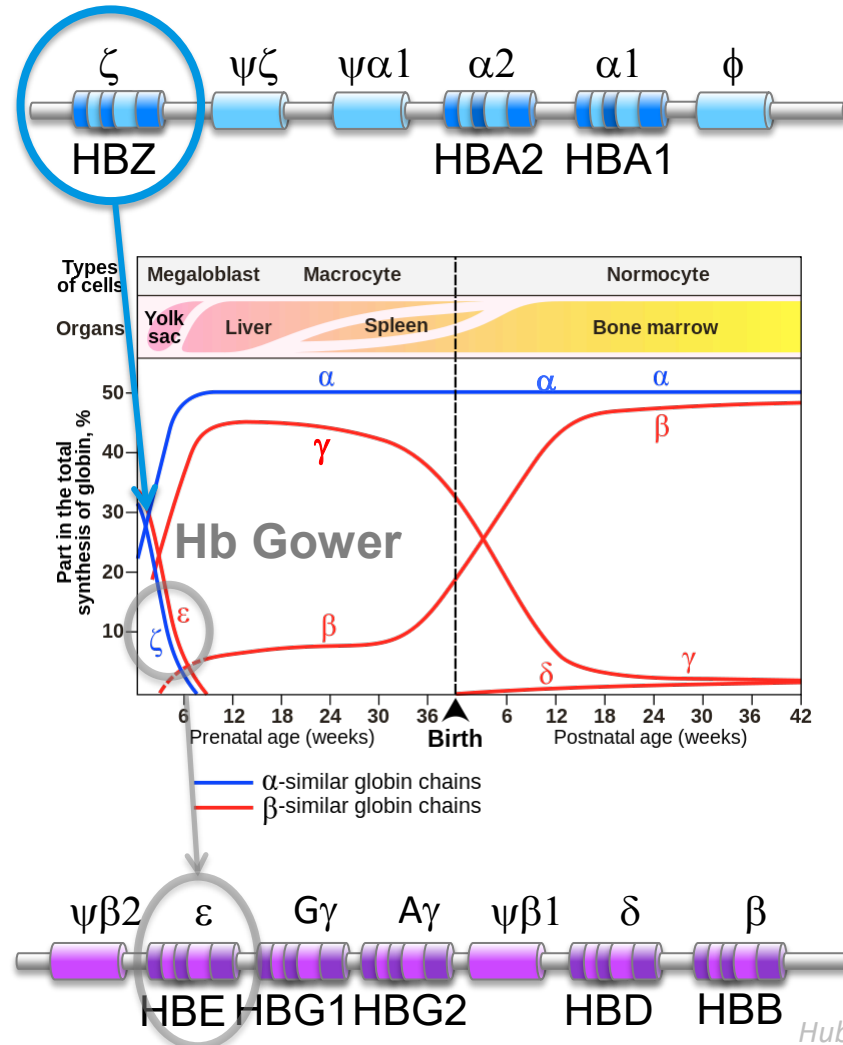


# Aufbau des Hämoglobins



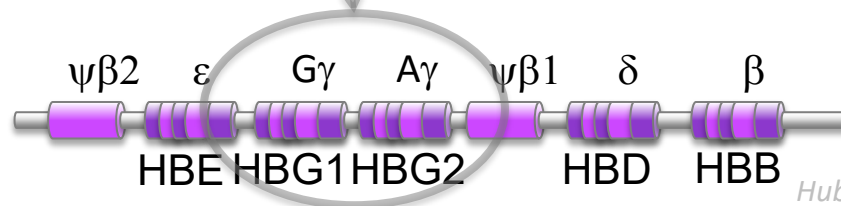
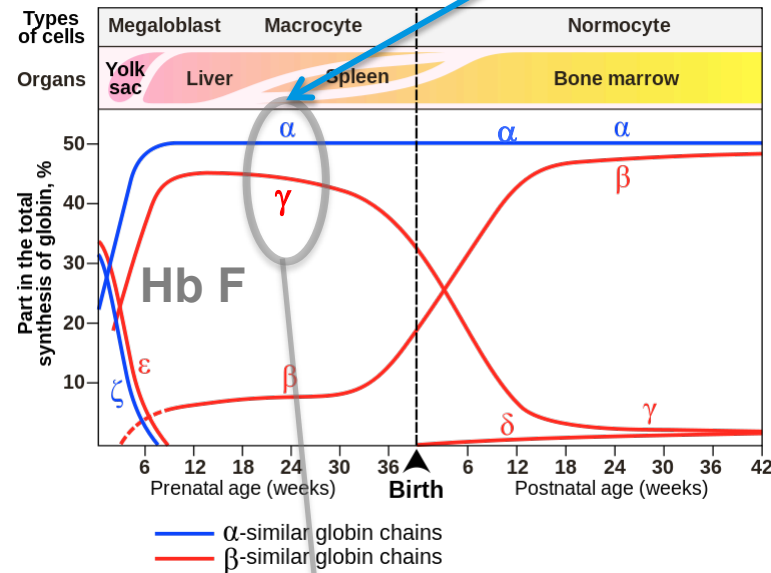
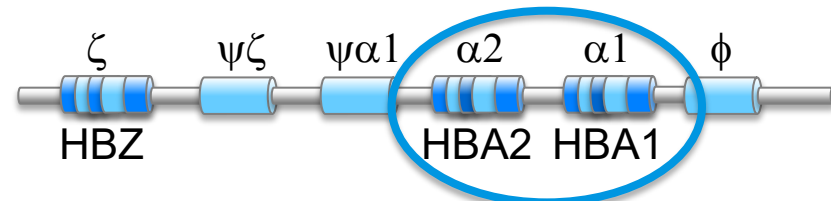
Typ	Ketten	Anteil (%)
Hb A	$\alpha_2 \beta_2$	95 - 96
Hb A <sub>2</sub>	$\alpha_2 \delta_2$	<3.2
Hb F	$\alpha_2 \gamma_2$	<1.5

# Ontogenese der Hämoglobine

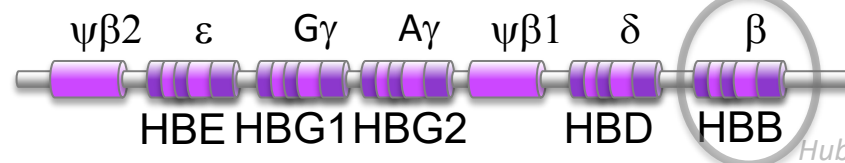
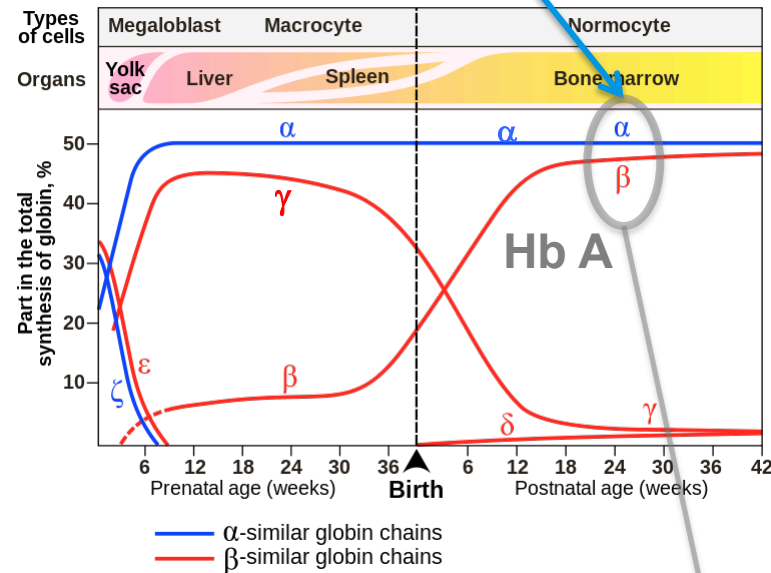
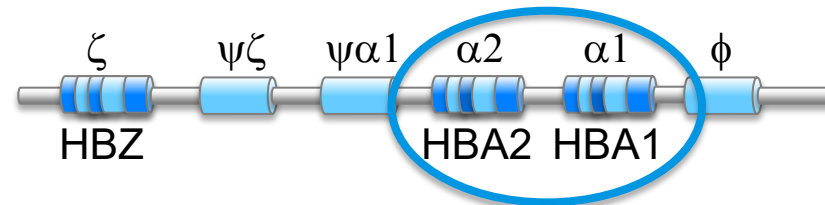




# Ontogenese der Hämoglobine

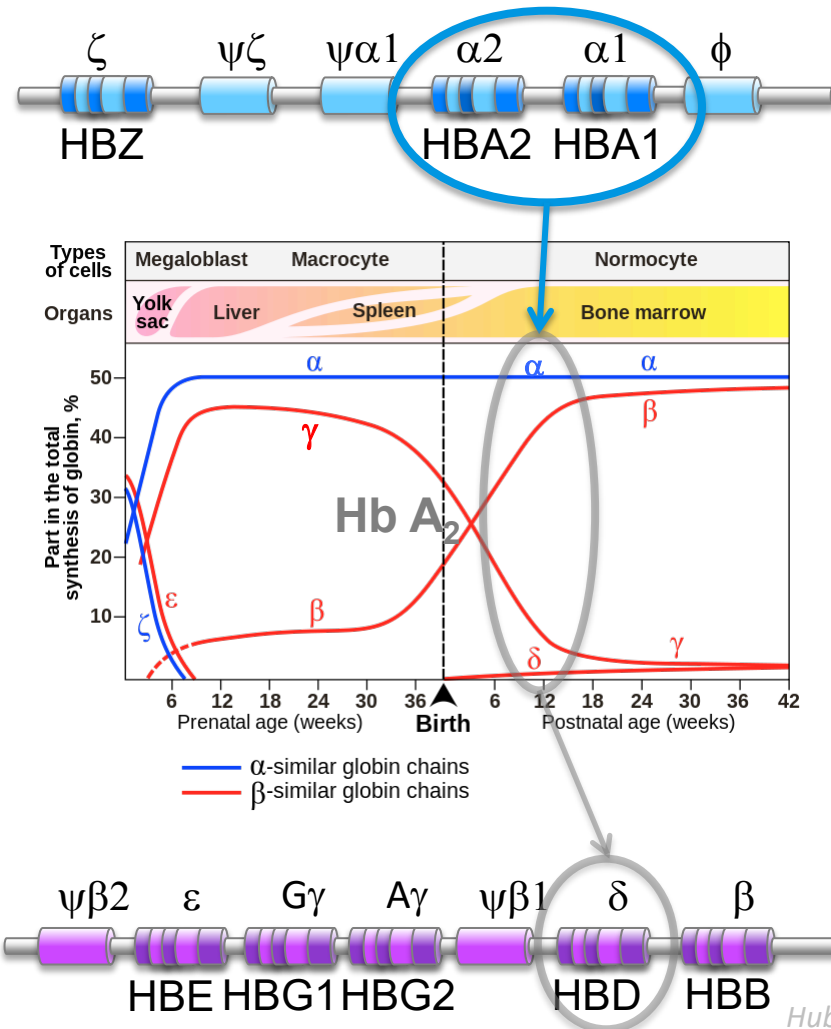


# Ontogenese der Hämoglobine



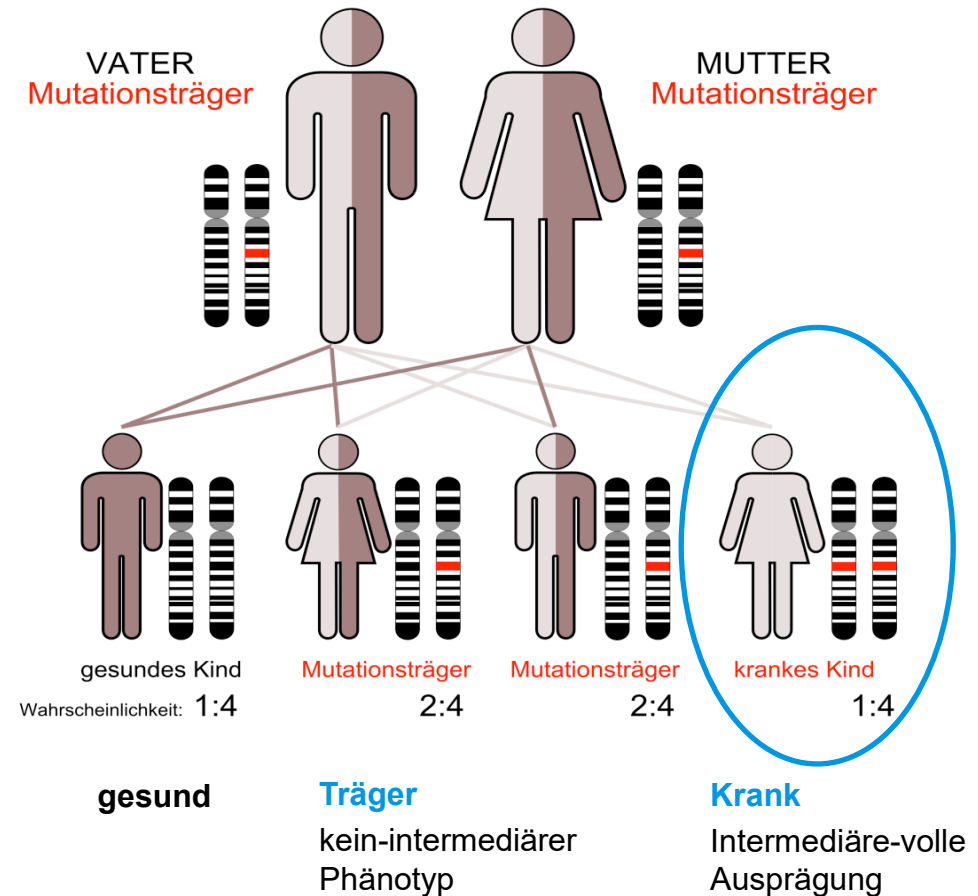


# Ontogenese der Hämoglobine

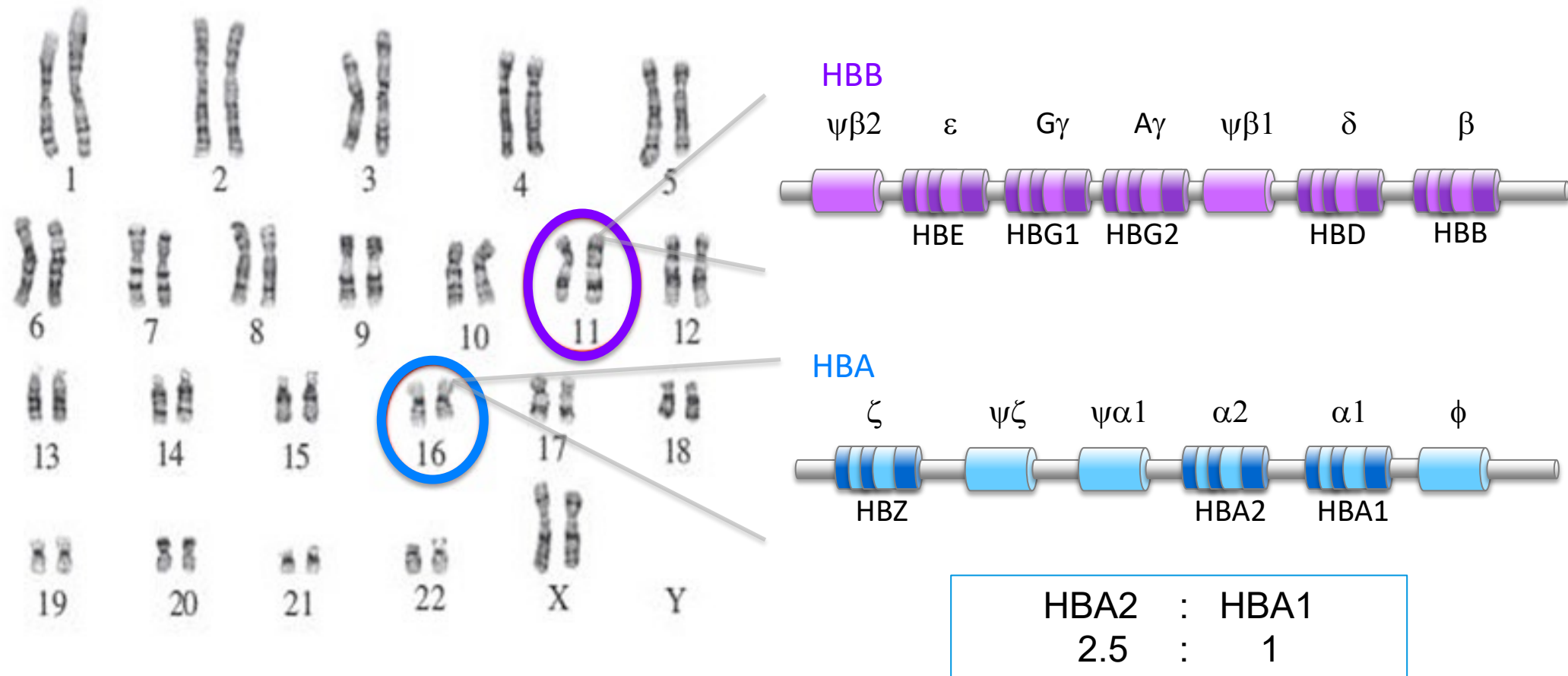


# Hämoglobinopathien – genetische Ursache –

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

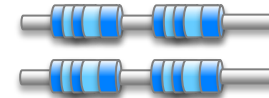


# Chromosomale Position der Hb-Gene

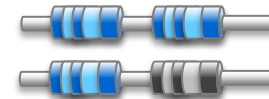


# Phänotypische Klassifikation der $\alpha$ -Thalassämien

Gesund, Wildtyp



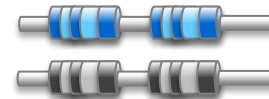
“silent”  $\alpha$ -Thalassämie



Unauffällig bis leicht vermindertes Hb, MCV, MCH

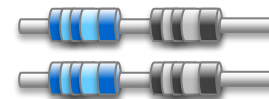
$\alpha$ -Thalassämie Trait

Heterozygot für  $\alpha^0$

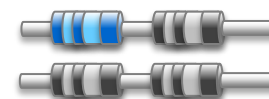


Milde mikrozytäre, hypochrome Anämie

Homozygot für  $\alpha^+$

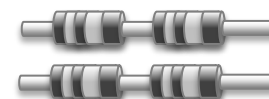


HbH Krankheit



Moderate mikrozytäre, hypochrome Anämie

Hb Bart's Hydrops Fetalis Syndrom (letal)



Schwere mikrozytäre, hypochrome Anämie

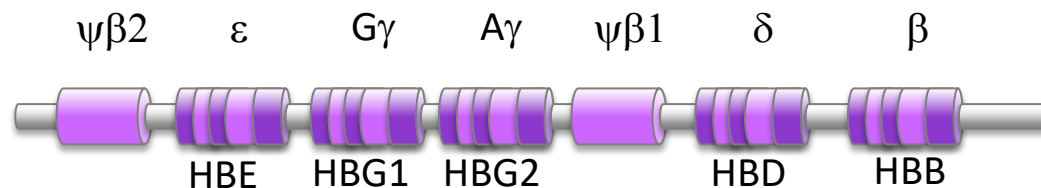
# Phänotypische Klassifikation der $\beta$ – Thalassämien

➤ Defekte  $\beta$ -Globinketten-Synthese oder –Funktion:

Thalassämie – minor → reduzierte Menge

Thalassämie – intermedia

Thalassämie – major → sehr wenig oder keine  $\beta$ -Globinketten



# Therapie

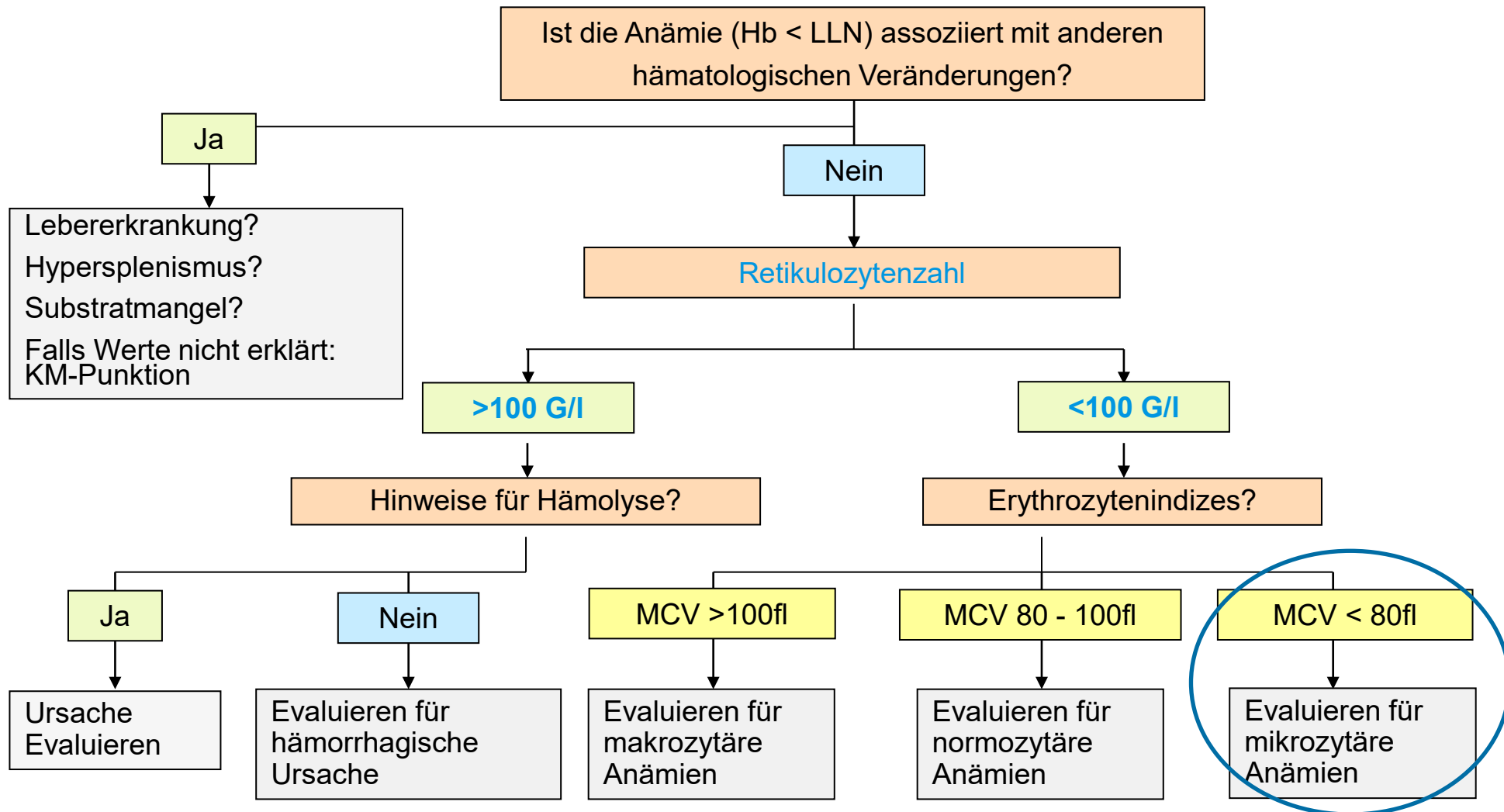
## ➤ Minorformen

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

## ➤ Majorformen

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

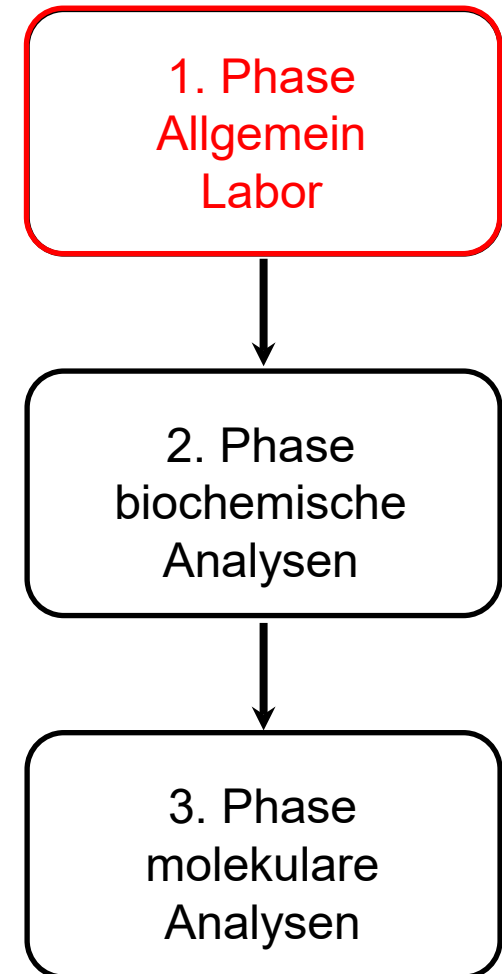
# Diagnostischer Algorithmus der Anämien





# 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)

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

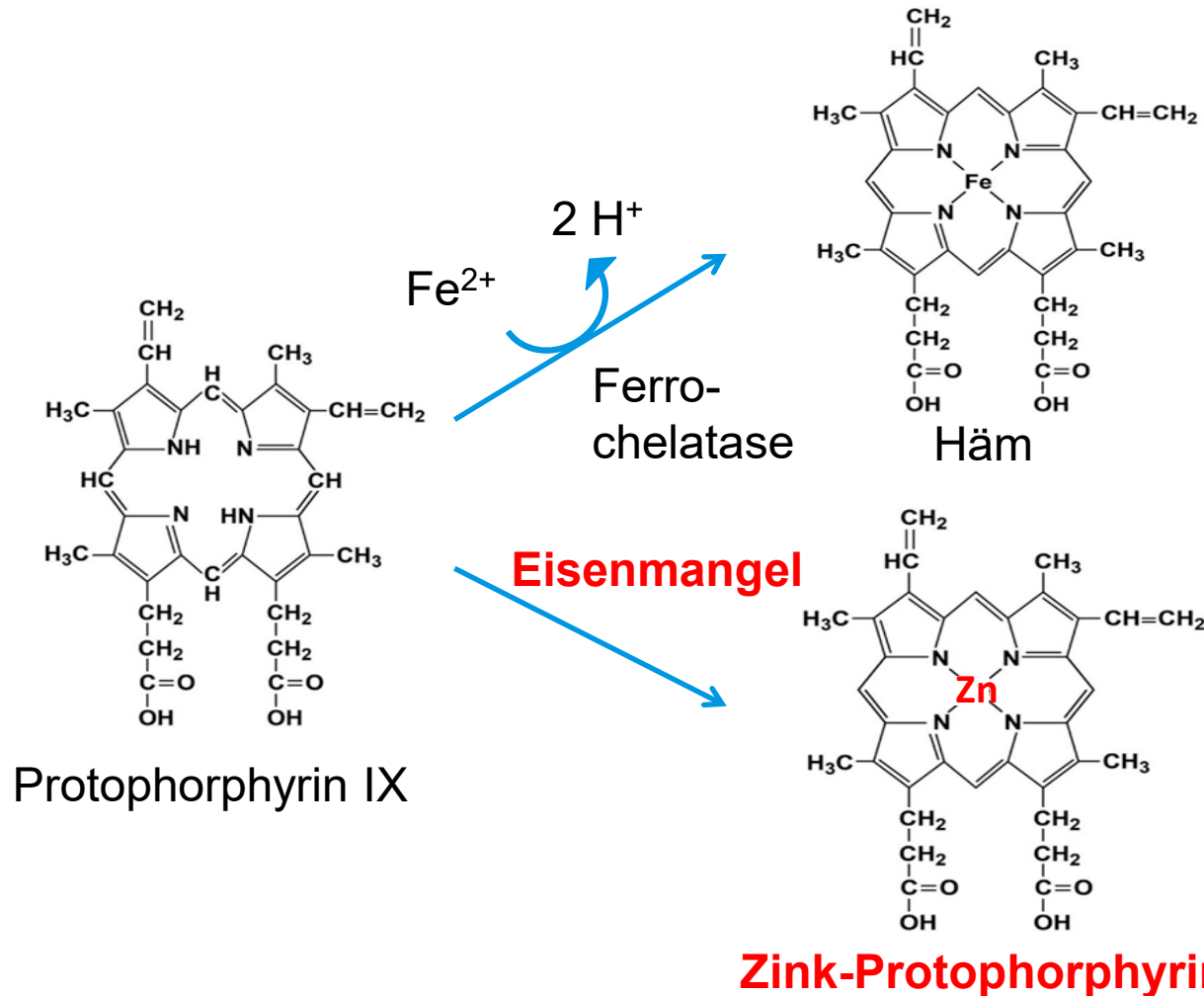
**Eisenmangel** > 23

**Graubereich** 21-23

**Thalassämie** < 21

# Eisenmessung: Zink-Protoporphyrin-Messung

Ziel: Hinweis auf Eisenmangel-bedingte Anämie

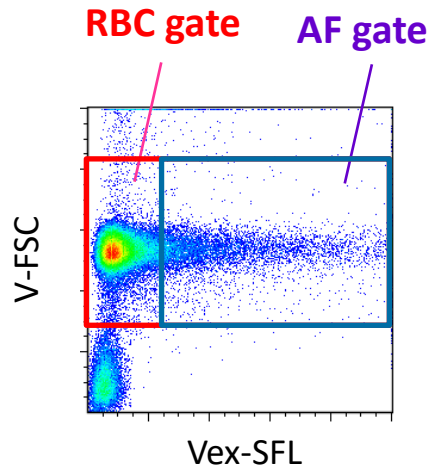


## Erhöhte Werte:

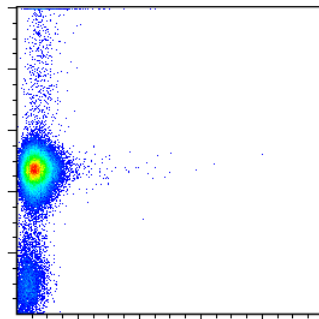
- Eisenmangel
- Bleivergiftung
- MDS
- Anämie bei chronischen Erkrankungen

# Blue Laser Technology von Sysmex™

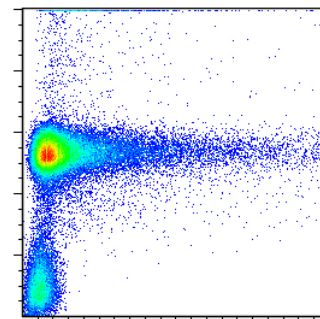
➤ «erythrocyte auto-flourescence rate» = AF



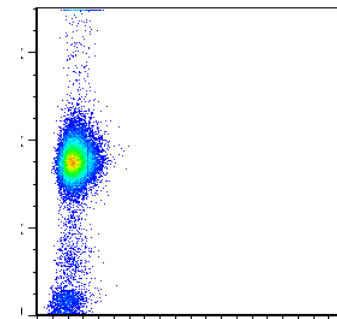
$$\text{Autofluorescence-rate (AF\%)} = \frac{\text{Cell number in AF gate}}{\text{Cell number in RBC gate}} \times 100$$



Keine Anämie

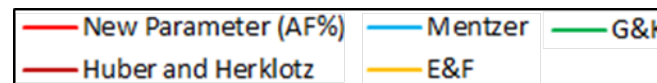
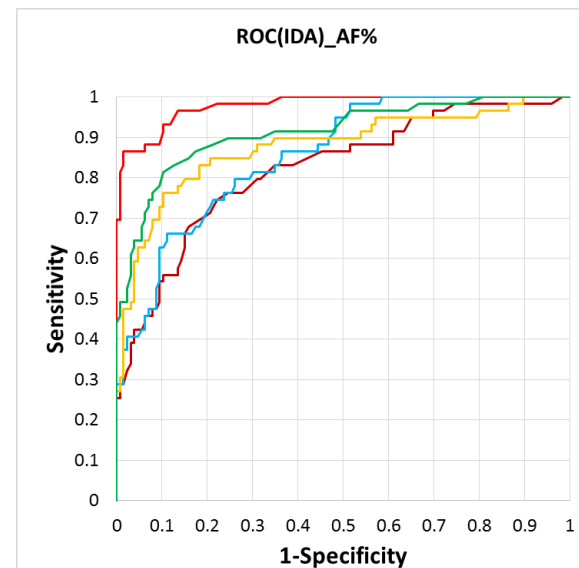
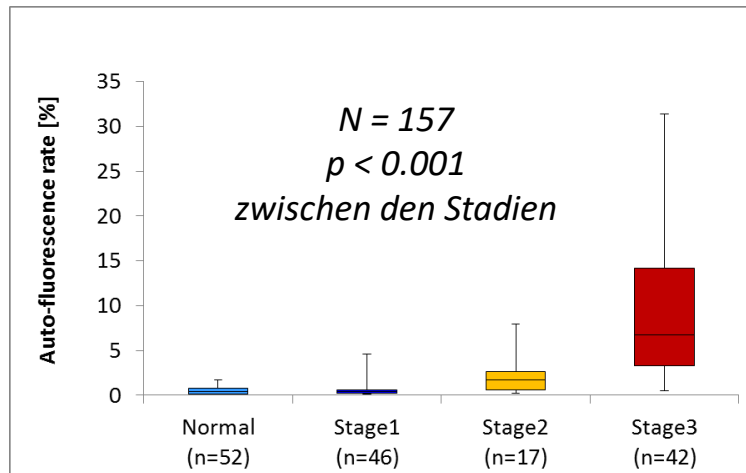


Eisenmangel



β-Thalassämie

# Diagnostische Performance für $\alpha/\beta$ -Thalassämien vs. Eisenmangel

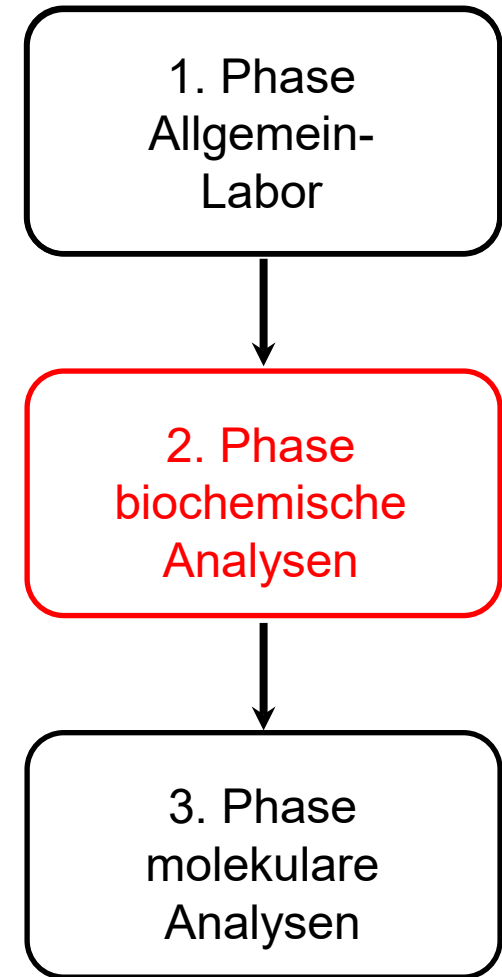
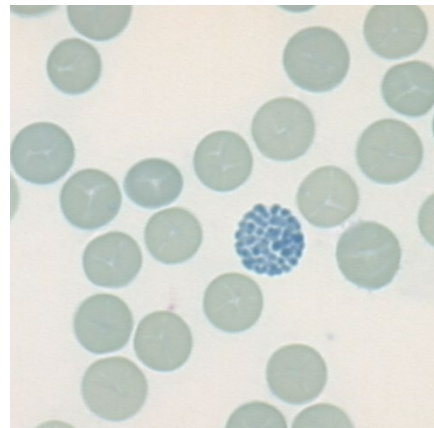
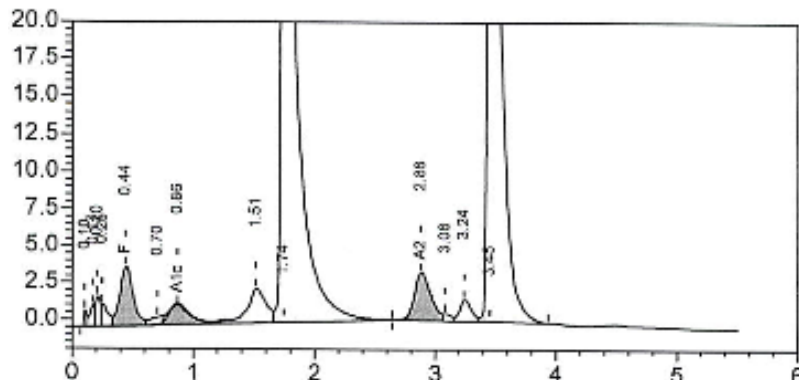


Formula	AUC
New parameter(F%)	0.978*
G&K	0.913*
E&F	0.877
Mentzer	0.856
Huber and Herklotz	0.822

*\*p = 0.005  
für AF% vs. G&K*

# Diagnostischer Algorithmus

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



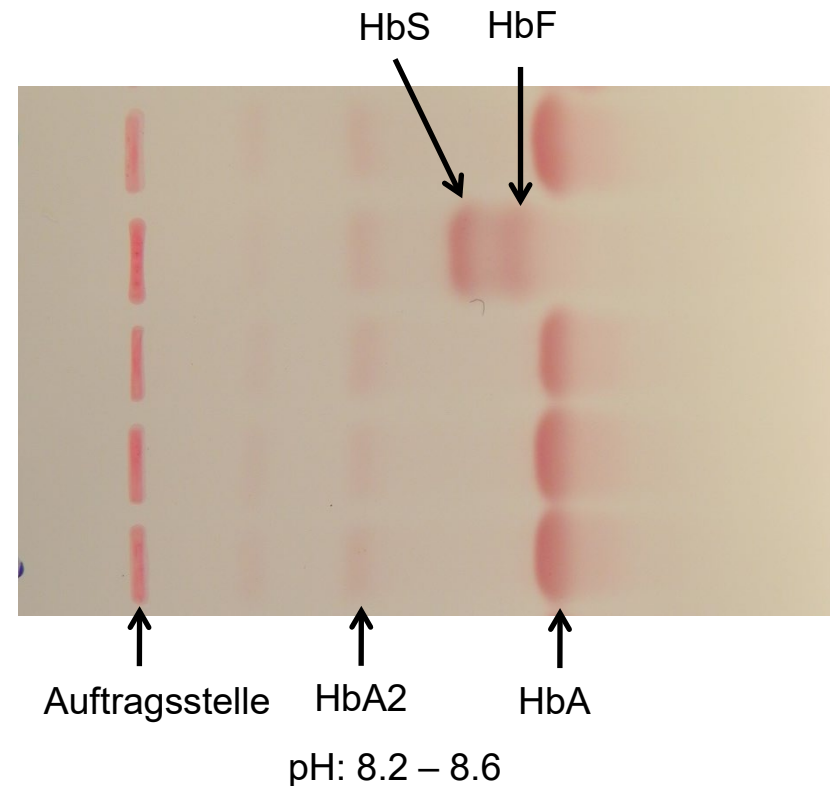
# Identifikation der Hämoglobin-Fraktionen

## Methoden

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

Krankheit	Auftragsstelle	HbA <sub>2</sub>	HbS	HbF	HbA	HbH
normal oder $\alpha$ -Thalassämie*		orange			orange	
heterozygotes HbS		orange	orange		orange	
homozygotes HbS (Sichelzellkrankheit)		orange	orange		orange	
heterozygote $\beta$ -Thalassämie (Thalassaemia minor)		orange		orange	orange	
homozygote $\beta^0$ -Thalassämie (Thalassaemia major)		orange		orange		
compound Heterozygotie von HbS mit einer $\beta^0$ -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



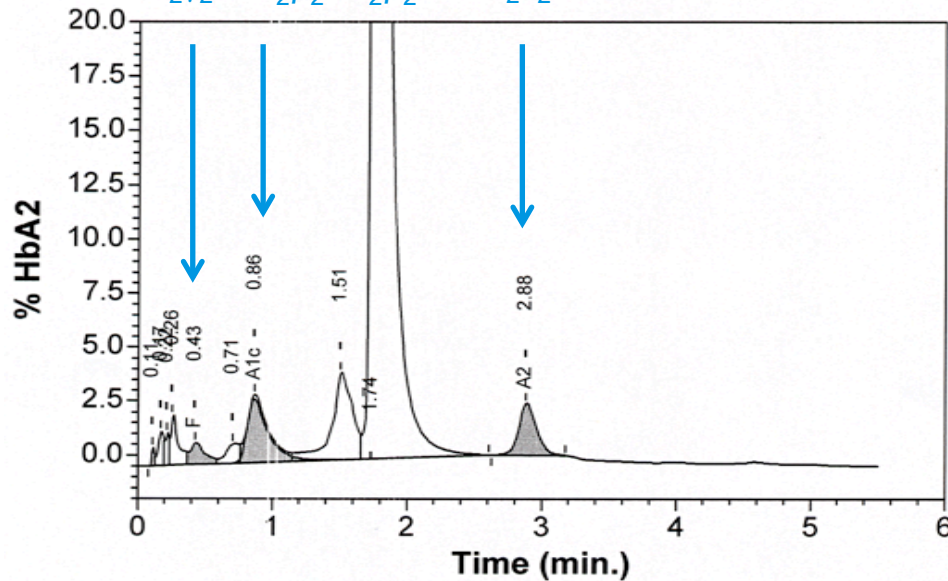


# Identifikation der Hämoglobin-Fraktionen

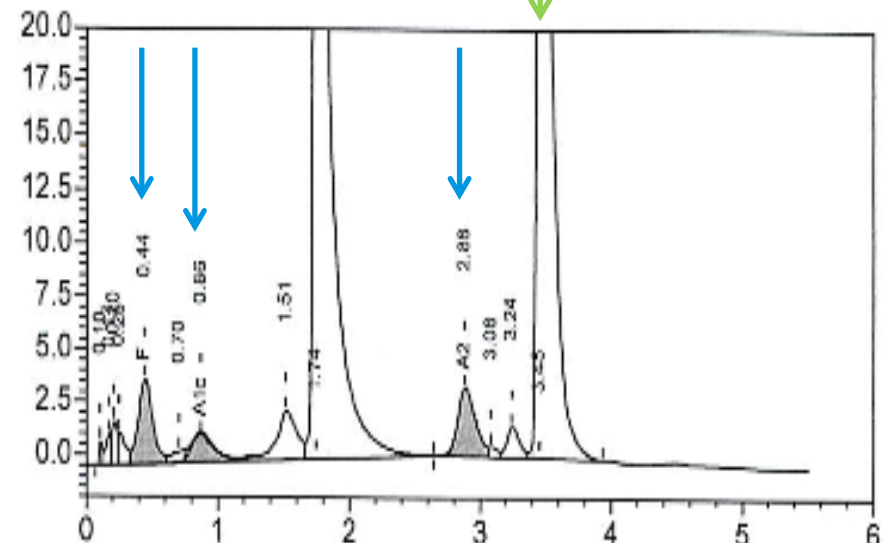
## Methoden

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

Gesunder HbF HbA HbA HbA<sub>2</sub>  
 $\alpha_2\gamma_2$   $\alpha_2\beta_2$   $\alpha_2\beta_2$   $\alpha_2\delta_2$



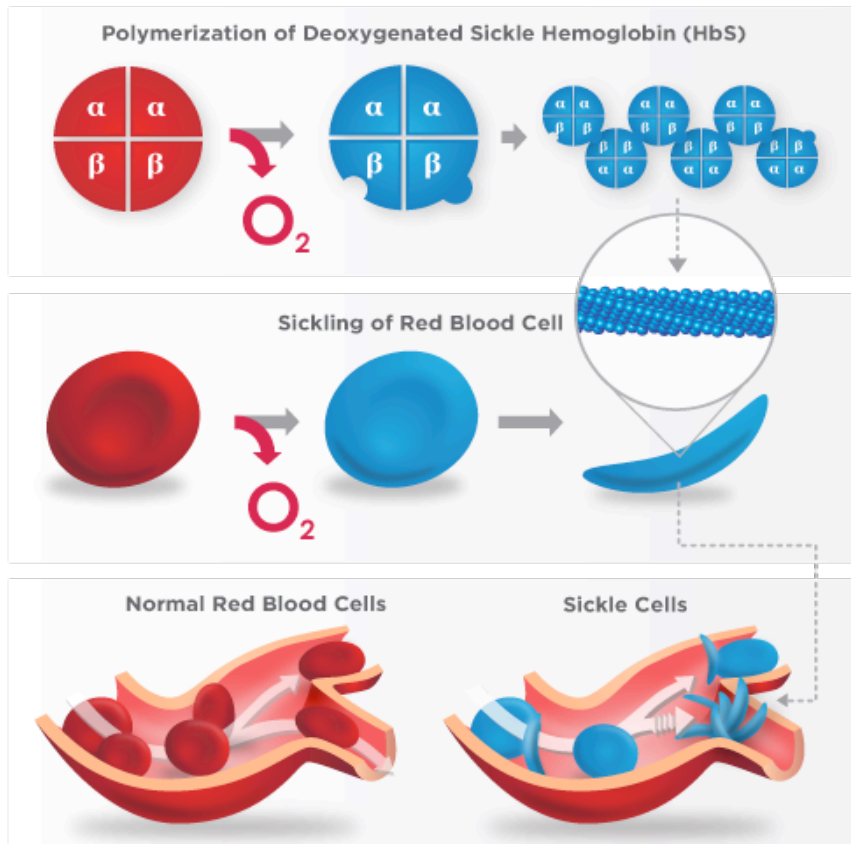
Hb AS HbF HbA HbA HbA<sub>2</sub> HbS



# Hb S: Sichelzelltest

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

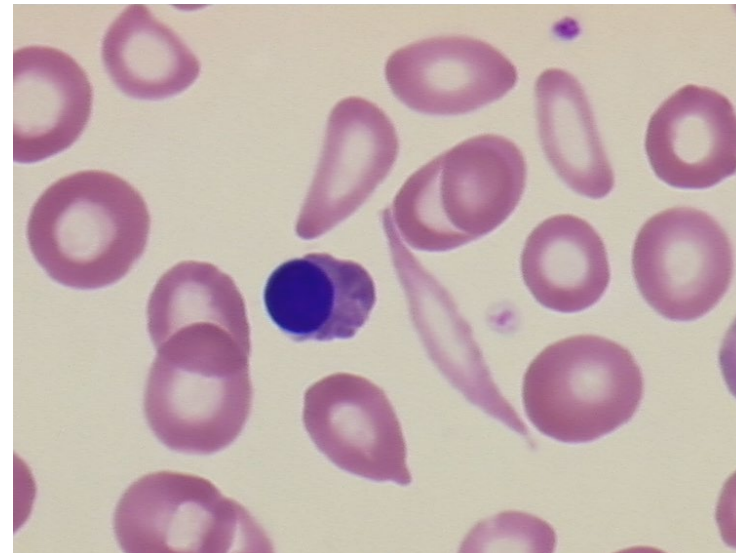
## Mechanism of Sickle Cell Disease



«Sicheln» der desoxygenierten Sichelzellen

→ Blutausstrich unter  $O_2$ -Entzug: Induktion des Sichelns

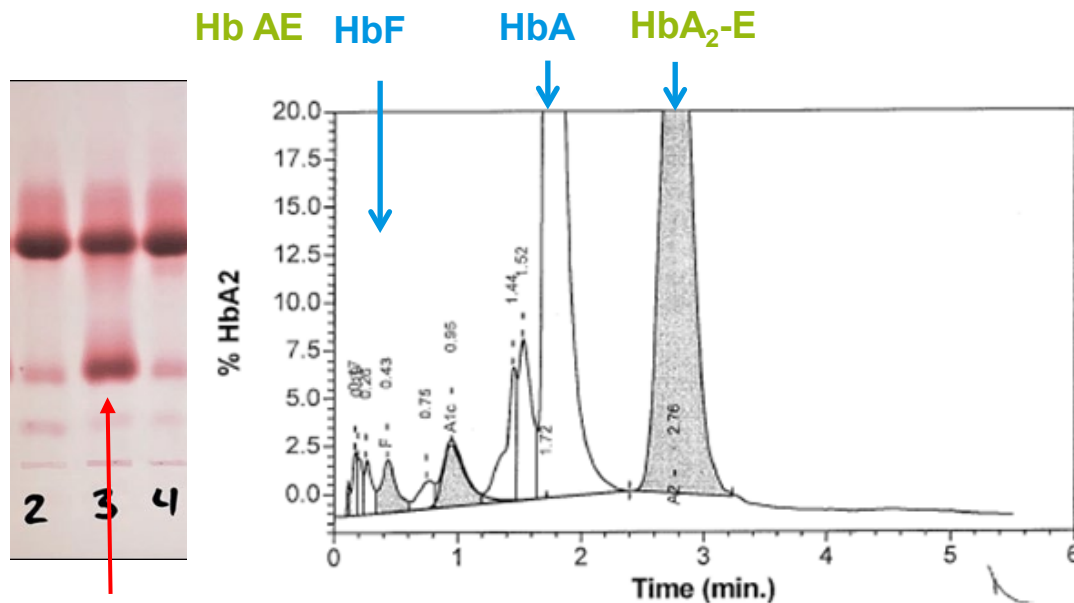
- Polymerisierung des Hb S
- Verformung des Erythrozyten (Sichelzelle)
- Duktilitätsverlust



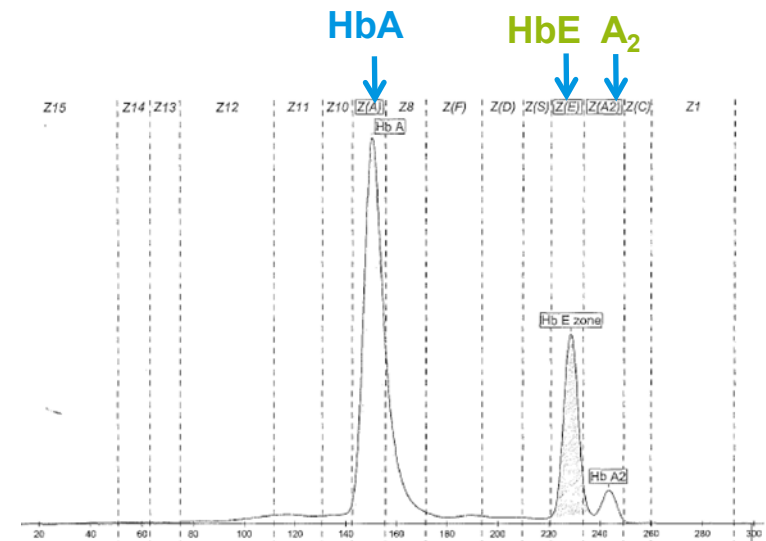
# Identifikation der Hämoglobin-Fraktionen

## Methoden

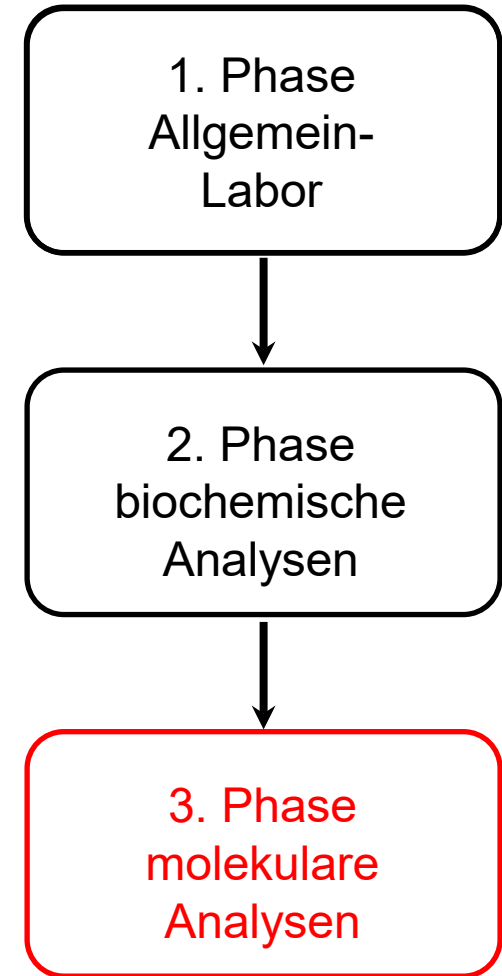
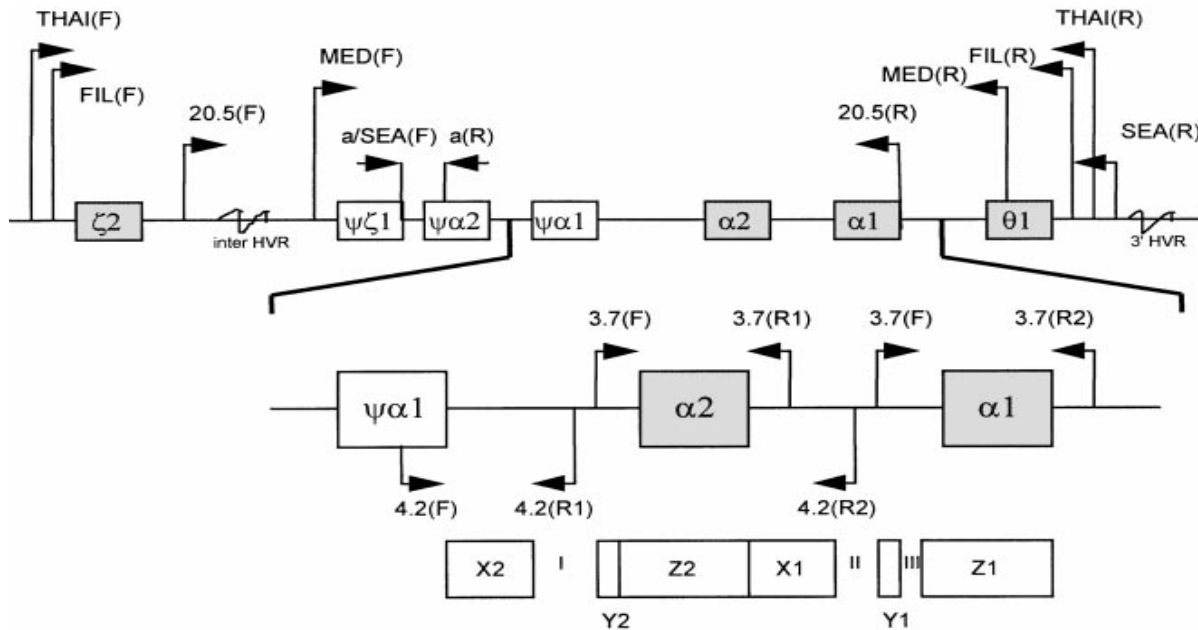
- **CAF** (Celluloseacetatfolien-Elektrophorese)
- **HPLC** (High performance liquid chromatography)
- **CE** (Kapillarelektrophorese)



HbE heterozygot



# Diagnostischer Algorithmus



# Deletionsanalyse

## GAP-PCR (Polymerase Chain Reaction)

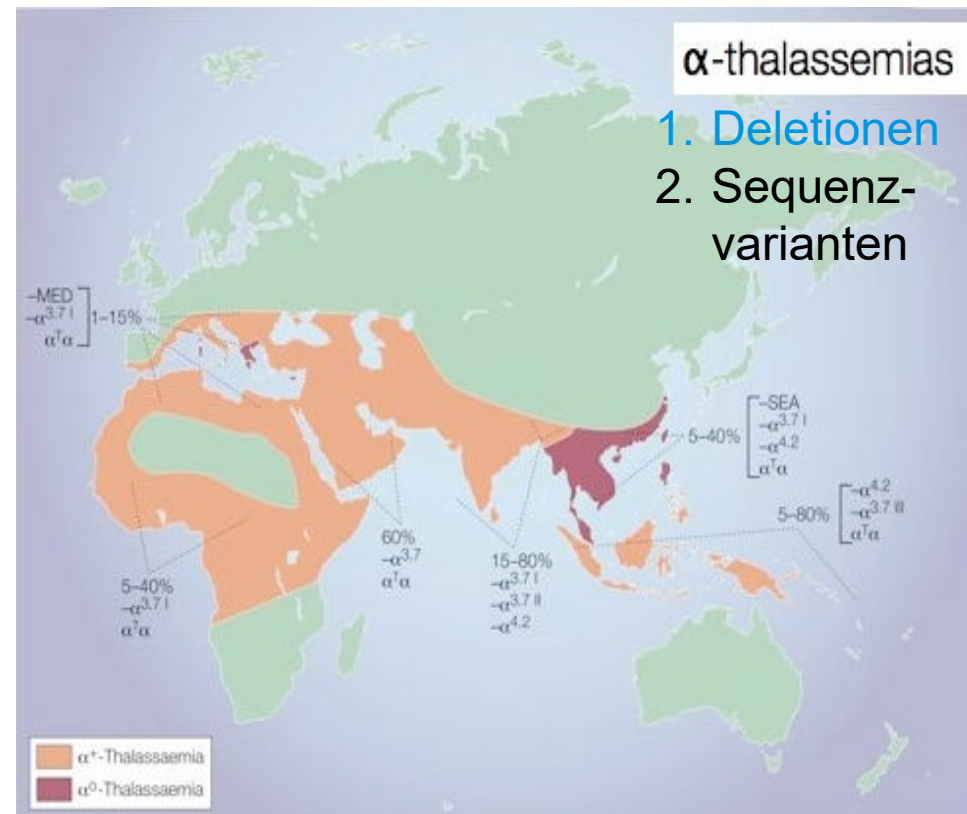
Anwendung:

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

## MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification)

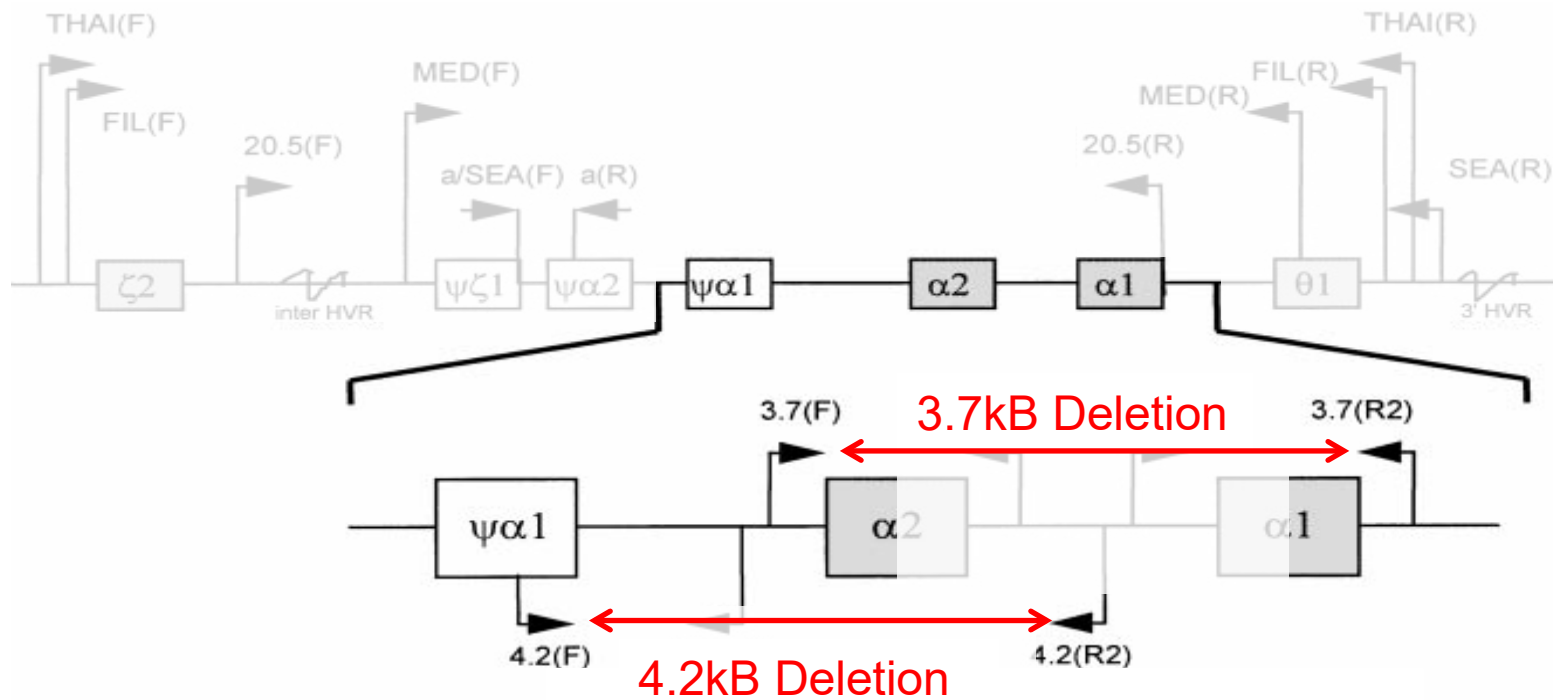
Anwendung:  $\alpha$ - und  $\beta$ -Thalassämien

- Komplexere Deletionen



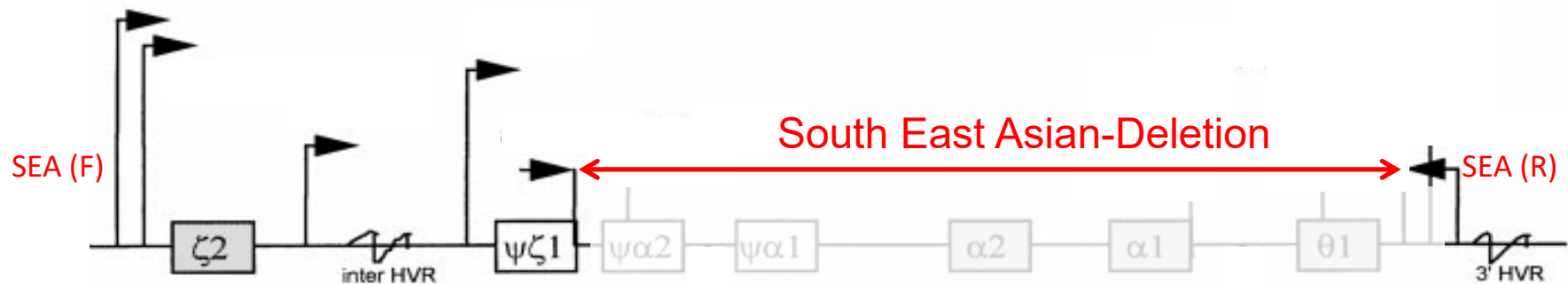
# Deletionsanalyse: GAP-PCR

Bsp:  $\alpha^+$ -Thalassämie



# Deletionsanalyse: GAP-PCR

Bsp:  $\alpha^0$ -Thalassämie

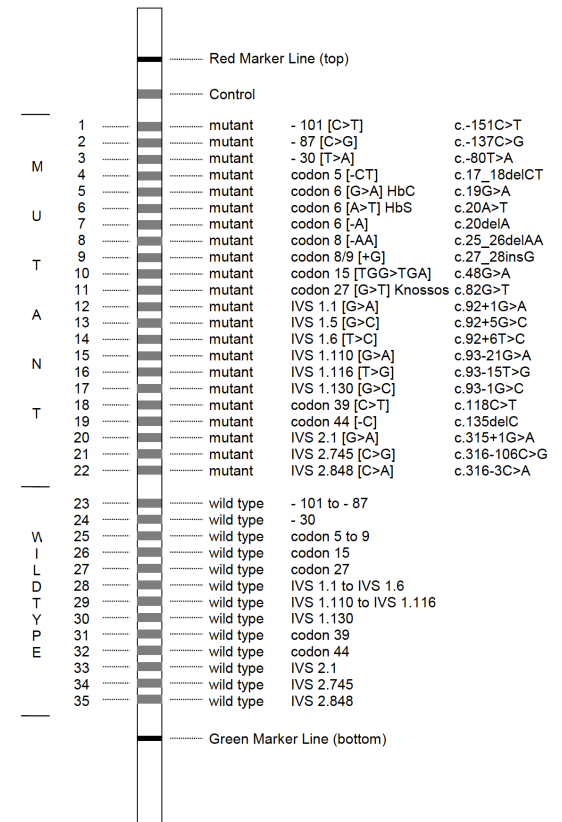
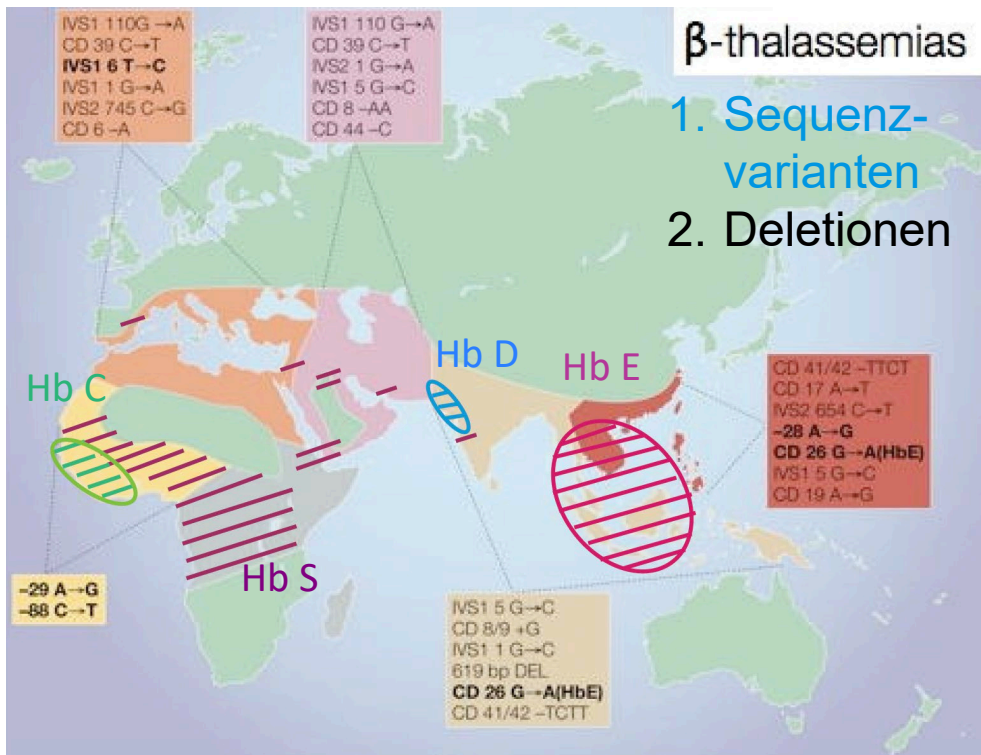






# Sequenzvarianten: Beta-Strip

Ziel: Bestimmung der 22 häufigsten Sequenzvarianten des  $\beta$ -Globingens



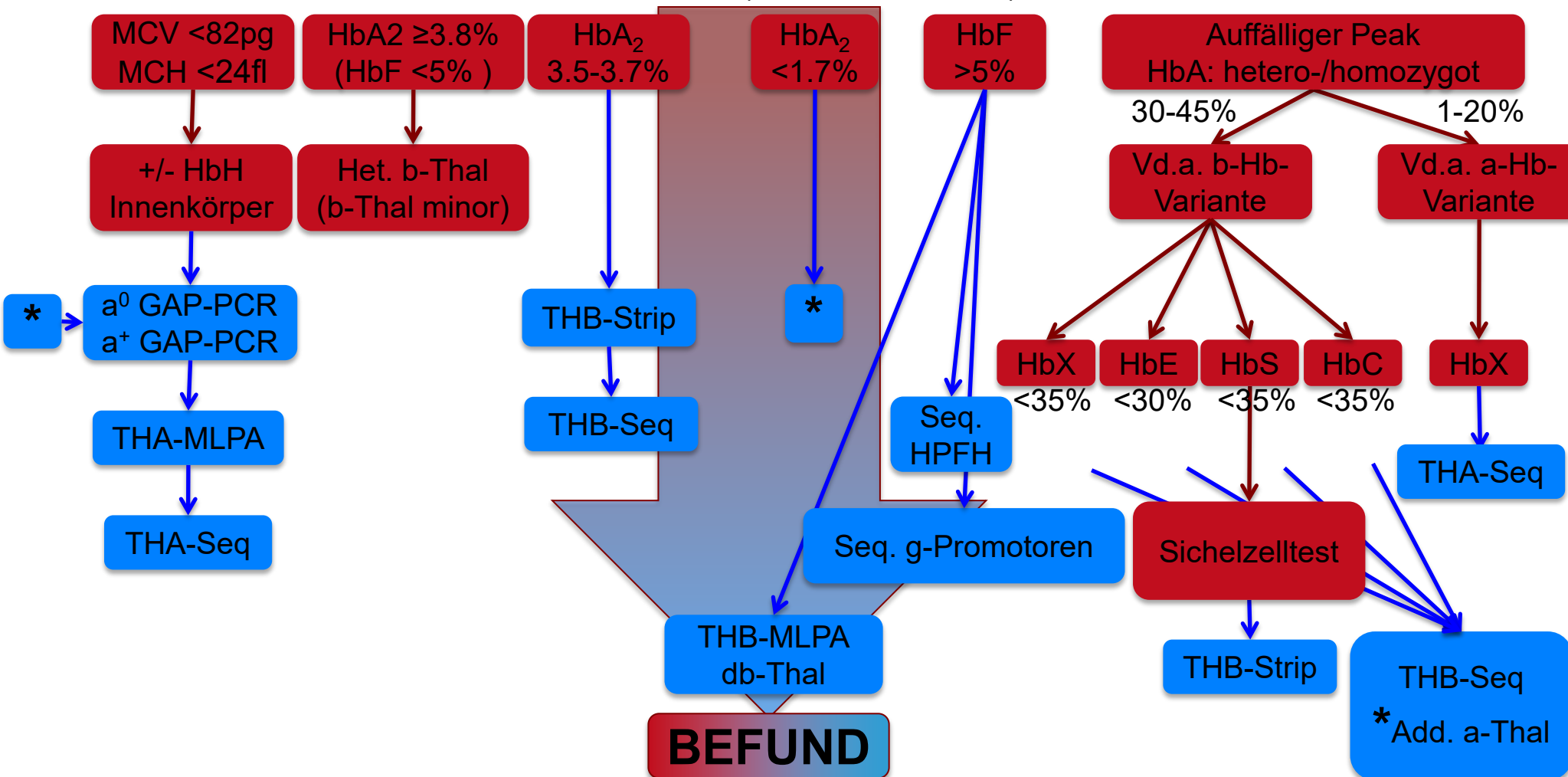
# Sequenzvarianten: Sequenzierung

Ziel: Bestimmung patientenspezifischer DNA-Sequenzvarianten in  $\alpha$ - &  $\beta$ - 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

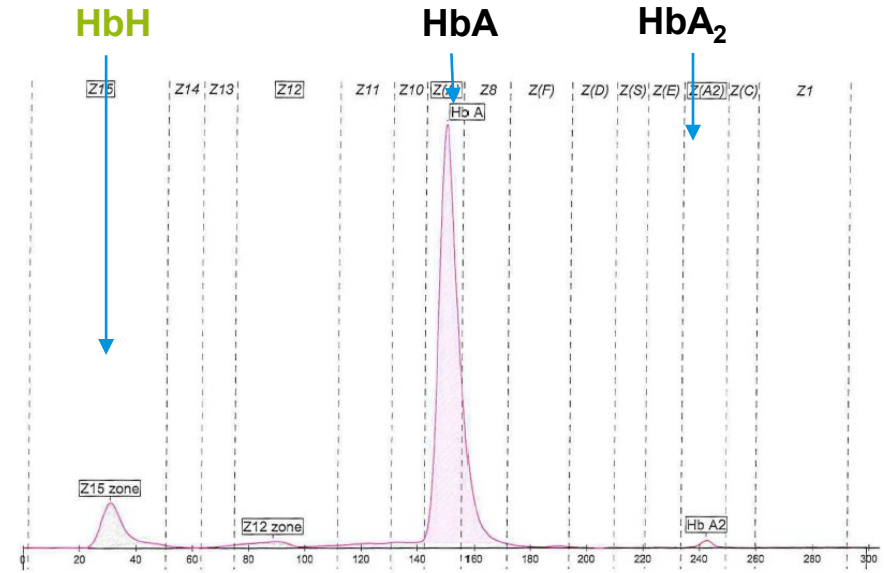
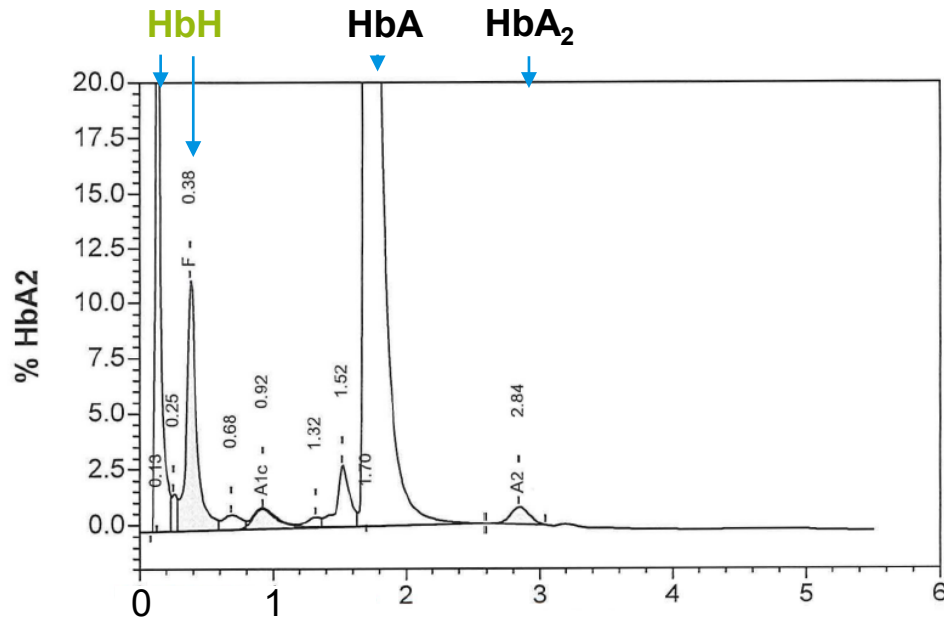
1. Ferritin
2. Leberparameter (ALAT)
3. Entzündungsparameter (CRP)
4. Zinkprotoporphyrin
5. Thalassämie / Hämoglobinopathie Abklärung
6. Hämolyseparameter
7. Antwort 1 & 4
8. Alles (1-6)
9. Stufendiagnostik: zuerst Eisenmangel ausschliessen, danach Thalassämie / Hämoglobinopathie Abklärung



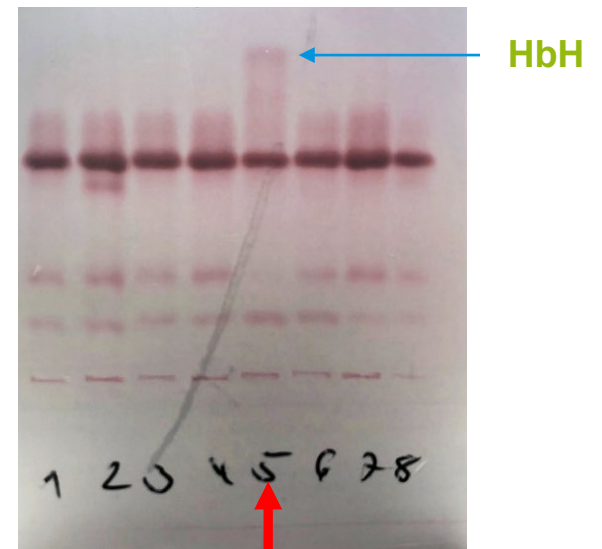
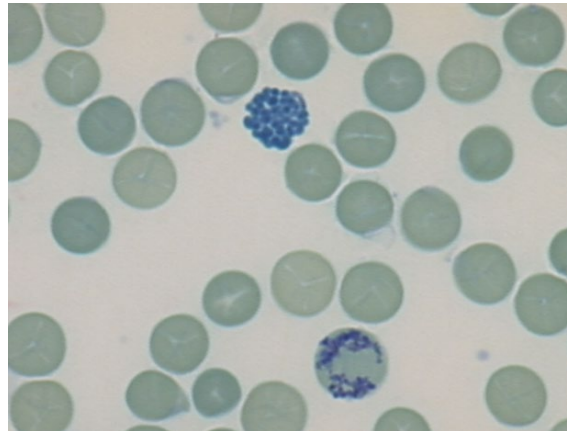
# Befunde

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 <sub>2</sub>	0.8



# Fallbeispiel

## Frage 2

Ihre Verdachtsdiagnose lautet:

1.  $\beta$  - Thalassämia minor
2.  $\beta$  - Thalassämia major
3.  $\alpha$  – Thalassämia minima (heterozygote  $\alpha^+$  Thalassämie)
4. HbH-Krankheit (compound heterozygot)
5.  $\alpha$  – Thalassämia minor (homozygote  $\alpha^+$  Thalassämie)

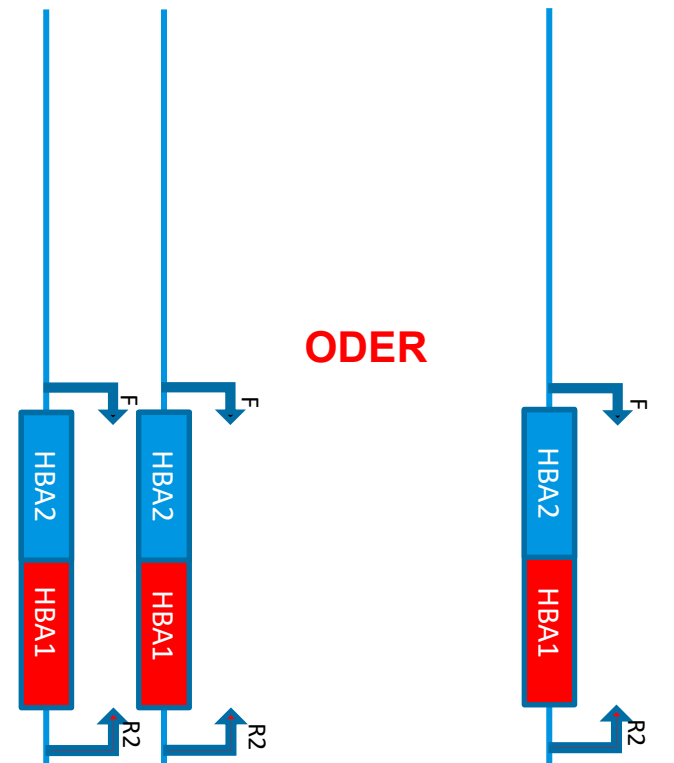
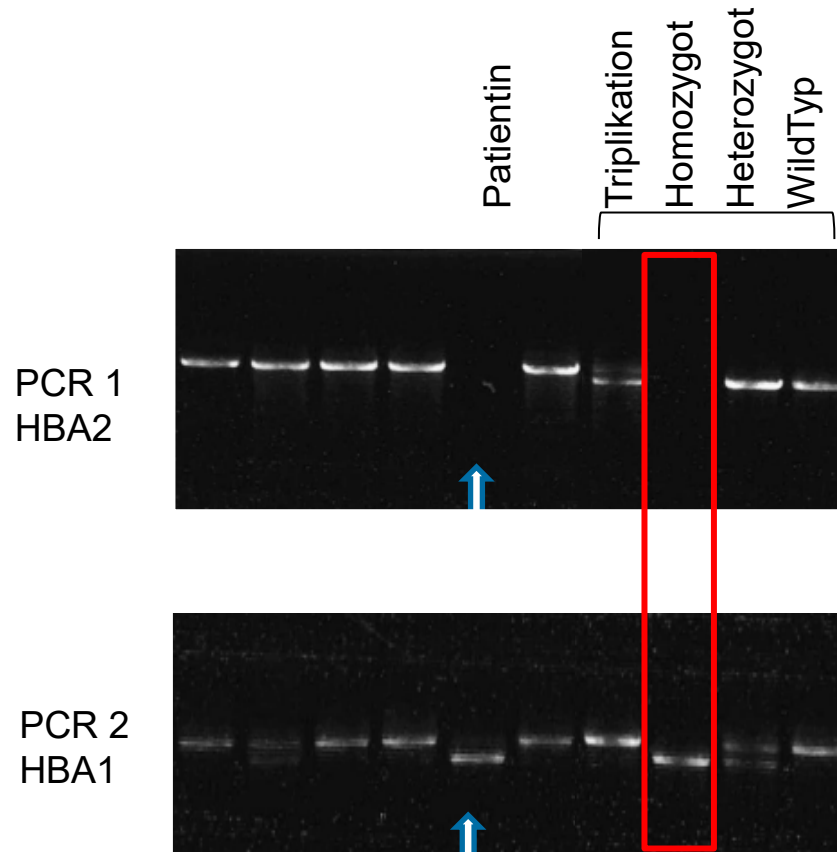
# Fallbeispiel

## Frage 2

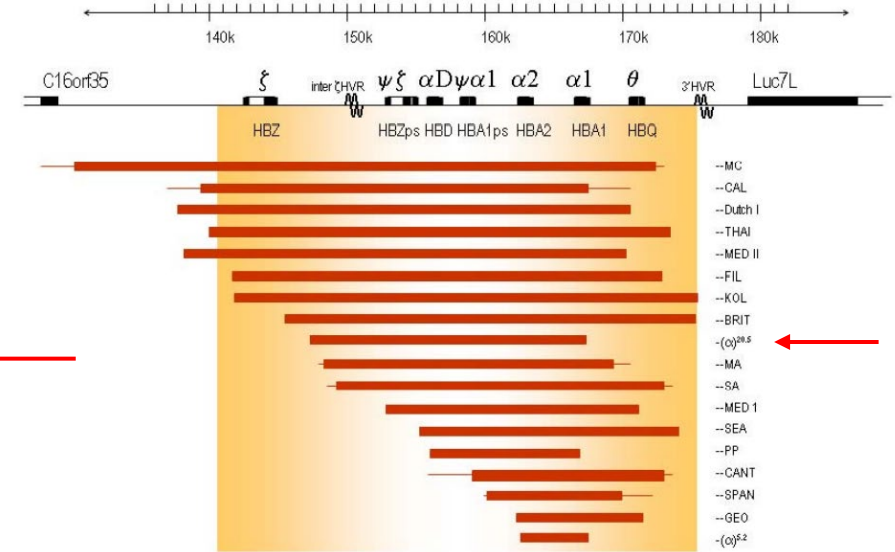
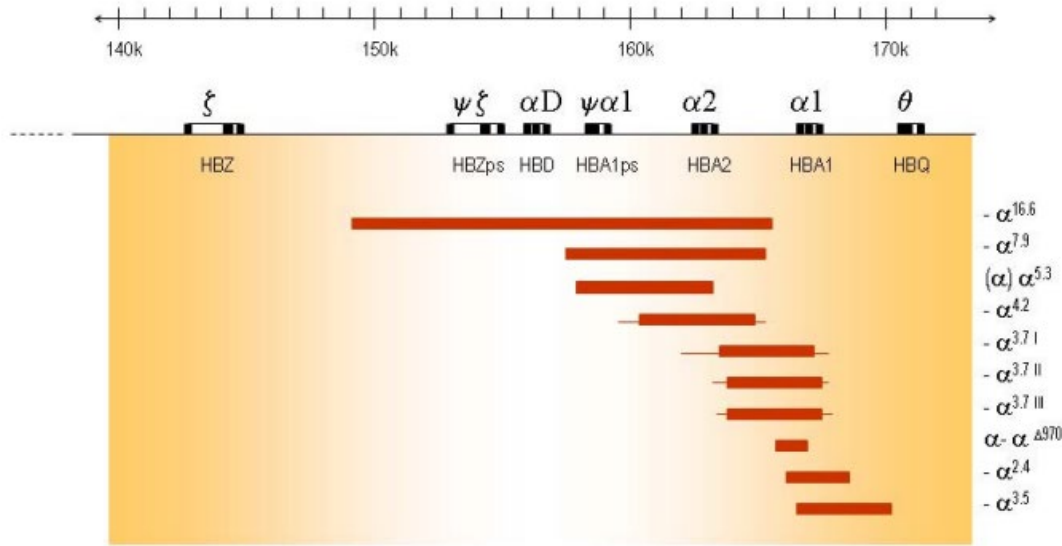
Ihre Verdachtsdiagnose lautet:

1.  $\beta$  - Thalassämia minor
2.  $\beta$  - Thalassämia major
3.  $\alpha$  – Thalassämia minima (heterozygote  $\alpha^+$  Thalassämie)
4. HbH-Krankheit (compound heterozygot)
5.  $\alpha$  – Thalassämia minor (homozygote  $\alpha^+$  Thalassämie)

# Fallbeispiel Genetik – GAP PCR –



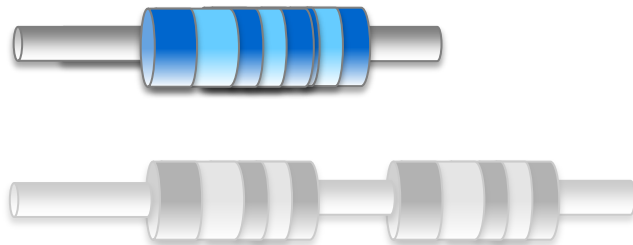




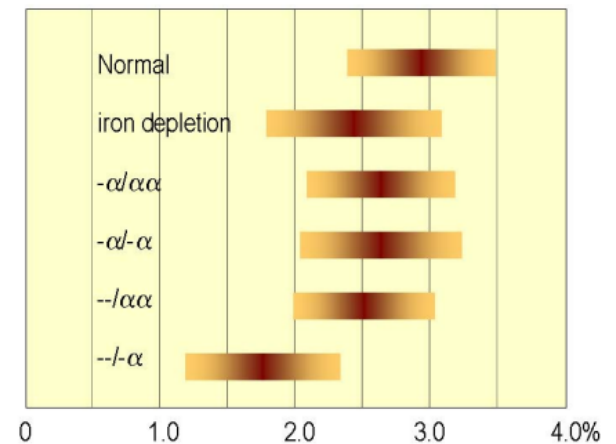
**Figure 5** Deletions of one  $\alpha$ -gene giving rise to  $\alpha^+$ -thalassaemia. The extent of the deletion is shown as bars, thin lines indicate regions of uncertainty of the breakpoints.

**Figure 6** Deletions of two  $\alpha$ -genes giving rise to  $\alpha^0$ -thalassaemia.

$\alpha$



Haemoglobin A<sub>2</sub> levels in different  $\alpha$ -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?