

B-Hemoglobinopatiutredning

Innehåll

B-Hemoglobinopatiutredning	1
1 Bakgrund	2
1.1 Utredningsflöde	2
1.2 Screeningundersökning; B-Hb, Erc-MCH, B-HbA2 och B-HbF	3
1.3 Schema för selektion till DNA-utredning	4
1.4 DNA-analyser vid hemoglobinopati	4
1.5 Att tänka på inför hemoglobinopatiutredning	4
1.5.1 Järnbrist	4
1.5.2 Blodtransfusion	5
1.5.3 Barn <2år	5
1.5.4 Släktutredning	5
1.5.5 Graviditet och fosterdiagnostik	5
2 Svar/tolkning/Bedömning	6
2.1 Svarstid	6
3 Metodik/mätprincip	6
3.1 B-Hb och Erc-MCH	6
3.2 Kromatografi (HPLC); kvantifiering av B-HbA2 och HbF samt variantdetektion	7
3.3 Kapillärelektrofores (CE); kvantifiering av B-HbA2 och HbF samt variantdetektion	7
3.4 NGS (riktad amplikonsekvensering)	7
3.5 MLPA	8
3.6 Sangersekvens	8
4 Metodkaraktistika	8
4.1 Mätområde	8

4.2 Spårbarhet	10
4.3 Mätosäkerhet	11
4.4 Ackreditering.....	12
5 Referenser	12

1 Bakgrund

Hemoglobin är ett makromolekylärt komplex bestående av globinkedjor, hemgrupper och järn. Den hemoglobinform som är mest frekvent förekommande benämns HbA och består av två alfa-globinkedjor och två beta-globinkedjor. Hemoglobinet uppgift är att transportera syre och koldioxid samt att fungera som buffertsystem.

Hemoglobinopatier kan indelas i thalassemier och hemoglobinvarianter. Thalassemi innebär en minskad produktion (kvantitativ förändring) medan en hemoglobinvariant innebär ett strukturellt förändrat protein det vill säga en förändring av aminosyrastrukturen (kvalitativ förändring). Dessutom finns det blandformer, så kallade thalassemiska hemoglobinvarianter där en hemoglobinvariant uttrycks i lägre grad. Både hemoglobinvarianter och thalassemier förekommer för såväl alfa-globinkedjan som beta-globinkedjan.

Det finns långt över 1500 genetiska varianter beskrivna. Vissa av dessa ger inte upphov till sjukdom medan andra leder till olika sjukdomstillstånd med varierande grad av anemi och allvarlig kronisk sjukdom.

Kvalitativ förändring	Kvantitativ förändring
Alfa-globinvariant, t.ex. Hb Savaria	Alfa-thalassemi (sänkt produktion av alfa-globin)
Beta-globinvariant, t.ex. HbS (Sickle cell), HbC och HbD	Beta-thalassemi (sänkt produktion av beta-globin)
Blandformer	
Thalassemisk alfa-globinvariant, t.ex. Hb Constant Spring	
Thalassemisk beta-globinvariant, t.ex. HbE	

1.1 Utredningsflöde

Följande analyser ingår vid hemoglobinopatiutredning när den görs vid Klinisk kemi och Farmakologi, Medicinsk Service, Region Skåne.

Screeningundersökning med B-Hb, Erc-MCH, kromatografisk samt kapillärelektroforetisk analys där B-HbA₂ och B-HbF kvantifieras och hemoglobinvarianter kan detekteras.

Vissa prover selekteras sedan för DNA-undersökning med frågeställning alfa-thalassemi, beta-thalassemi eller hemoglobinvariant. I vissa undantagsfall kan även andra ovanliga thalassemiformer misstänkas.

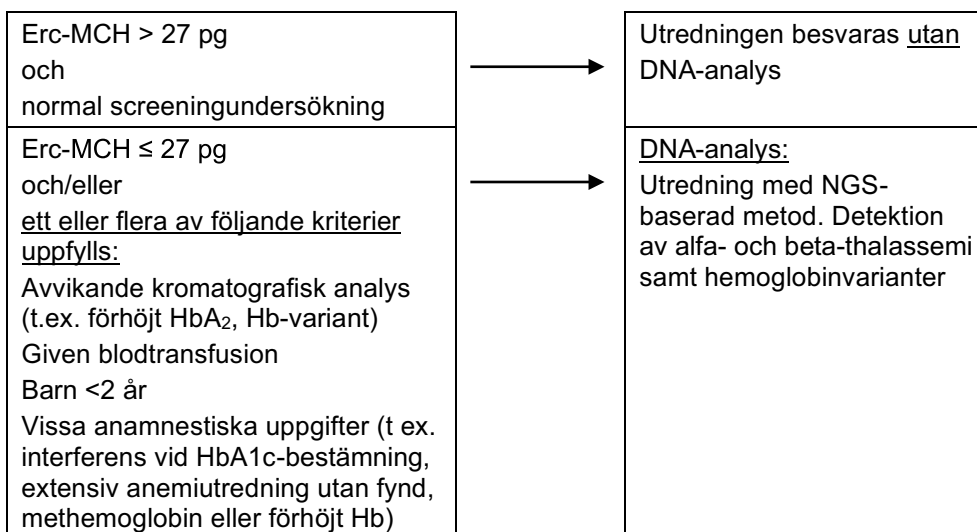
Analysen beställs som ”Hemoglobinopatiutredning” via elektronisk beställning, pappersremiss: Kemi - specialremiss Lund, eller en konsultremiss. Anamnes underlättar vid selektion till DNA-analys och bör därför anges, se även ”Att tänka på inför hemoglobinopatiutredning” nedan.

Svarstiden är ca 1 vecka om endast screeningundersökning utförs, medan svarstiden blir ca 6–8 veckor om även DNA-analyser utförs.

1.2 Screeningundersökning; B-Hb, Erc-MCH, B-HbA₂ och B-HbF

Initialt analyseras B-Hb och Erc-MCH (För mer information om dessa båda analyser var god se respektive analys i Analysportalen). Därefter analyseras Hb-fraktionerna i provet med en kromatografisk metod och med kapillärelektrofores. Procentandelen HbA₂ och HbF bestäms och granskning för att detektera hemoglobinvarianter görs. Med dessa screeningmetoder ses de vanligast förekommande hemoglobinvarianterna som HbS (Sicklecell), HbC, HbD och HbE, men även många andra hemoglobinvarianter kan upptäckas. Patientprov med normalt utfall på dessa screeningparametrar går inte vidare till DNA-undersökning. Beslut om DNA-utredning görs enligt schemat nedan.

1.3 Schema för selektion till DNA-utredning



1.4 DNA-analyser vid hemoglobinopati

Förstahandsmetoden för genetisk-analys vid misstänkt hemoglobinopati är en amplikonbaserad NGS-analys (Devyser Thalassemia NGS).

Kompletterande utredning kan eventuellt göras med annan metodik beroende på frågeställning. För att verifiera punktmutationer och små deletioner eller duplikationer kan analys av generna med Sangersekvens göras. Större deletioner eller duplikationer verifieras med ”Multiplex ligation-dependent probe amplification” (MLPA).

Vi har även möjlighet att i vissa specialfall sekvensera delta-globingenen (HBD) och gamma-globingenernas promotorer (*HBG1* och *HBG2*).

1.5 Att tänka på inför hemoglobinopatiutredning

1.5.1 Järnbrist

Om det är möjligt, uteslut eller behandla eventuell järnbrist före utredning av hemoglobinopati. Med våra urvalskriterier för DNA-utredning avseende alfa-thalassemi (Erc-MCH ≤27 pg), kommer vissa patienter med järnbrist att utredas med DNA-analys i onödan. Dock kan järnbrist och thalassemi förstås förekomma samtidigt, men om utredningen avseende thalassemi kan vänta tills behandling med järnsubstitution utförts och erytrocytpopulationen hunnit ersättas, kan utredningen bli mer kostnadseffektiv.

1.5.2 Blodtransfusion

Efter given blodtransfusion, påverkas de screeningundersökningen som ingår i hemoglobinopatiutredningen. Anledningen är att patientens blodkroppar späts ut av de transfunderade blodkropparna. Det bästa är att om möjligt göra analysen innan en blodtransfusion ges. Om blodtransfusion redan är given måste detta anges på remissen, så att man vid bedömning av screeningundersökningen tar hänsyn till detta. I praktiken innebär det att en DNA-utredning utförs om patienten erhållit en blodtransfusion. (DNA-utredning kan göras eftersom vanligtvis leukocytbefriat erythrocytkoncentrat transfunderats och DNA extraheras från patientens egna leukocyter).

1.5.3 Barn <2år

Under fosterlivet uttrycks andra globinkedjor än ovan nämnda beta-globinkedjor, bland annat uttrycks gamma-globinkedjor som tillsammans med alfa-globinkedjor utgör fetalt hemoglobin, HbF. Prenatalt sker en ”switch” där de fetala generna uttrycks i allt mindre grad och framför allt beta-globingenen aktiveras. HbF har vanligtvis normaliserats, d.v.s. sjunkit till <1 % vid ca 12 månaders ålder. Under de första levnadsåren slås dessutom delta-globingenen på, vilket medför att även HbA₂ kan ses i blodet. Detta medför att några av våra vanliga urvalskriterier i screeningundersökningen (HbA₂ och HbF) är svårare att använda på barn under 2 år. Om det är kliniskt möjligt att vänta med utredning, blir därför den screeningundersökning som görs mer informativ om barnet är över 2 år gammalt. Vid misstanke om symptomgivande eller allvarlig hemoglobinopati ska dock utredning ske utan dröjsmål.

1.5.4 Släktutredning

På remissen kan man ange om det är en släktutredning som utförs, det vill säga om släktingar tidigare har utretts med hemoglobinopatiutredning. På remissen anges då genetiska fynd alternativt personnummer för de individer som tidigare utretts (efter inhämtat samtycke) samt släktskap.

1.5.5 Graviditet och fosterdiagnostik

I referensen Traeger-Synodinos, et al., 2015 (EMQN Best Practice Guidelines for molecular and haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies) anges vid vilka thalassemier och hemoglobinvarianter som fosterutredning kan övervägas. Vid osäkerhet om fosterdiagnostik behöver göras kan kontakt tas med Klinisk Kemi eller med Klinisk Genetik. Många hemoglobinvarianter och mildare alfa-thalassemier kan vara ofarliga även i homozygot form och det är viktigt att rätt patienter erbjuds utredning och att man inte utreder i

onödan. Denna typ av utredning bör helst äga rum i god tid innan planerad graviditet så att information om eventuell fosterdiagnostik kan diskuteras i lugn och ro. Observera att genetisk vägledning till patienter ombesörjs av Klinisk Genetik och remiss för detta kan skickas dit.

2 Svar/tolkning/Bedömning

Hemoglobinopatiutredning besvaras alltid med ett läkarutlåtande där resultat från samtliga utförda analyser vägs samman. Våra svar är uppdelade i fem avsnitt:

1. Analysresultat (mutationer anges med HGVS-nomenklatur)
2. Bedömning (förväntad fenotyp)
3. Ärftlighet (risk för nästa generation kommenteras; endast vid genetiska fynd)
4. Utförda analyser
5. Utsvarande läkares namn

Referensintervall:

B-Hb och Erc-MCH: var god se respektive analys.

B-HbA2 2,4 – 3,3 % (>2 års ålder)

B-HbF <1,1 % (>2 års ålder)

Referensintervall är ej tillämpligt på DNA-analyser. Analyserna besvaras med läkarutlåtande för Hemoglobinopatiutredning.

2.1 Svarstid

Om ett prov inte selekteras för genetiska analyser kommer svarstiden att vara ca 7 dagar från det att provet anlånt till laboratoriet. Om provet selekteras för genetiska analyser kommer svarstiden att vara 6 – 8 veckor.

3 Metodik/mätprincip

3.1 B-Hb och Erc-MCH

Var god se dessa analyser.

3.2 Kromatografi (HPLC); kvantifiering av B-HbA2 och HbF samt variantdetektion

Blodkropparna hemolyseras och härfter separeras de olika hemoglobinfraktionerna med hjälp av jonbyteskromatografi med gradienteluering och absorbansdetektion (VariantTM II beta-thalassemia Short Program). I kromatogrammet ses de normalt förekommande hemoglobinfraktionerna HbF (fetalt Hb, alfa- och gamma-globinkedjor), HbA (normalt Hb, alfa- och beta-globinkedjor) och HbA₂ (alfa- och delta-globinkedjor).

Hemoglobinvarianter (en mutation som ger ett aminosyrabytte i någon av hemoglobingenerna) kan ses som en extra topp i kromatogrammet. De vanligast förekommande hemoglobinvarianterna i världen är HbS (sickle-cell), HbC, HbD och HbE. Dessa och även många andra hemoglobinvarianter kan upptäckas med denna screeningmetod, dock upptäcks inte ”alla” hemoglobinvarianter med denna metod.

3.3 Kapillärelektrofores (CE); kvantifiering av B-HbA2 och HbF samt variantdetektion

HbA₂ och HbF separeras från övriga hemoglobinfraktioner kapillärelektroforetiskt med hjälp av CAPI 3 HEMOGLOBIN(E)-reagenskit på SEBIA CAPILLARYS 3 OCTA instrument.

Med denna teknik separeras laddade molekyler efter sin elektroforetiska rörlighet i en alkalisk buffert vid ett specifikt pH. Separation uppnås genom kombinerade krafter av elektroforetisk migration och elektroosmotiskt flöde. Fraktionerna detekteras spektrofotometriskt (415 nm) vid kapillärens katodände. I mjukvaran PHORESIS placeras Hb-fraktionerna i olika migreringszoner (Z1 – Z15) och identifieras automatiskt beroende på deras position som HbA, HbA₂ och/eller HbF.

3.4 NGS (riktad amplikonsekvensering)

Provet analyseras med ett amplikonbaserat NGS-kit (Devysr Thalassaemia NGS, Devysr®). Analysen omfattar sekvensering av *HBA2*, *HBA1* samt *HBB*, inklusive promotor-, exon- och intron-regioner på dessa gener. Även sekvensering av delar av *HBG1*-, *HBG2*- och *HBD*-promotorerna omfattas av kitet. Dessutom analyseras kopienummer (CNV-analys) för detektion av större deletioner/duplikationer på alfa- och non-alfa-lokus. Databearbetning görs i mjukvaran Amplicon Suite.

3.5 MLPA

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) är en PCR-baserad teknik som kan detektera variation i kopiaantal för en genomisk sekvens. Tekniken är särskilt gynnsam för frågeställningen deletioner och duplikationer och när flera genomiska områden samtidigt skall studeras. PCR-produkterna analyseras med kapillärelektroferes. En slutanalys av rådata sker med mjukvaran Coffalyser.

3.6 Sangersekvens

Sekvenseringsmetoden syftar till att sekvensbestämna promotorregionen, samtliga exon och exon/intron-gränser för den/de aktuella generna, förutom för HBG1 och HBG2 där endast promotorregionen analyseras. Först görs den primära PCR-reaktionen, då den specifika genen amplifieras med PCR-teknik ifrån isolerat genomiskt DNA med genspecifika primers. Efter rening av den primära PCR-produkten görs en sekvens-PCR med sekvensprimers och efterföljande rening av denna PCR-produkt innan sekvensering sker på kapillärelektroforesinstrument. Data jämförs sedan sinsemellan och mot en känd referenssekvens genom analys med mjukvaran SeqScape.

4 Metodkaraktistika

4.1 Mätområde

B-Hemoglobin och Erc-MCH

Var god se respektive analys.

B-HbA₂ och B-HbF

HbA₂ besvaras i intervallet 1,6 – 9,0 %

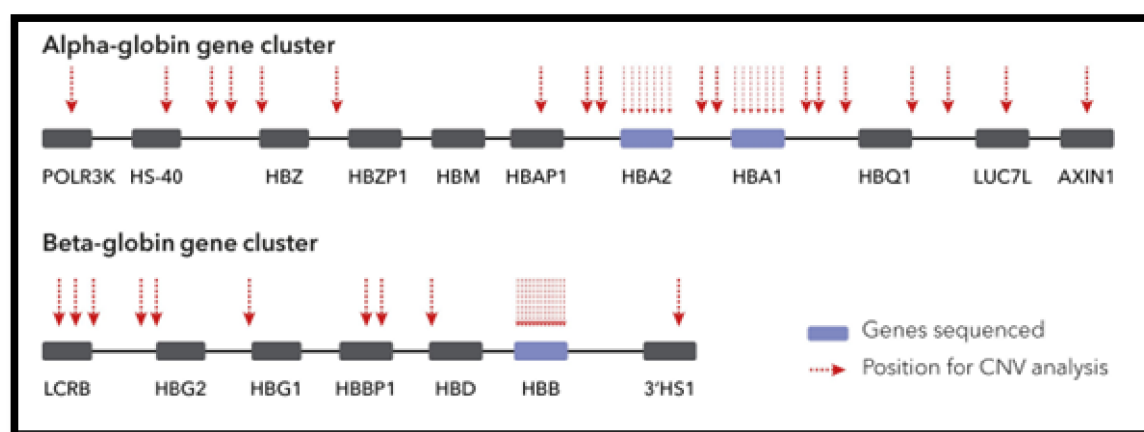
HbF besvaras i intervallet 1,2 – 79 %

NGS

Riktad amplikonsekvensering utförs (Devysen Thalassemia NGS, Devysr®) och analysen detekterar sekvensvarianter (SNVs, indels) och kopiaantalvarianter (CNVs, deletioner/duplikationer). Slutanalys görs i mjukvaran Amplicon Suite (Devysr®). Omfattningen av SNV- respektive CNV-analysen framgår nedan.

Gen	Referenssekvens	Täckning	Kommentar
HBA1	NM_000558.5	c.-101_*173	dock inte c.*19_*74
HBA2	NM_000517.6	c.-101_*141	
HBB	NM_000518.5	c.-290_c.*472	
HBD	NM_000519.4		Endast promotor
HBG1	NM_000559.3		Endast promotor
HBG2	NM_000184.3		Endast promotor

Omfattningen av SNV-analysen.



Omfattningen av CNV-analysen.

Sangersekvensanalys (HBA1, HBA2, HBB, HBD och promotorerna för HBG1 och HBG2)

Sekvens från båda strängar, såväl forward som reverse, skall vara av god och läsbar kvalitet motsvarande PHRED 20, för att en klinisk analys skall kunna godkännas.

Omfattning av analyserna:

Gen	Referenssekvens	Täckning	Kommentar
HBA1	NM_000558.5	c.-100_c.*110	
HBA2	NM_000517.6	c.-100_c.*110	
HBB	NM_000518.5	c.-390_c.*233	c.315+110_c.316-255 analyseras endast i undantagsfall
HBD	NM_000519.4		Endast promotor
HBG1	NM_000559.3		Endast promotor
HBG2	NM_000184.3		Endast promotor

MLPA alfa-lokus

SALSA® MLPA® kit P140 HBA version C1 detekterar variation i kopieantal i 33 olika sekvenser i HBA regionen, 11 referenssekvenser utanför HBA-regionen samt även detektion av Hb Constant Spring-mutationen. MLPA rekommenderas inte som enda analys för detektion av punktmutationer, resultatet måste alltid kompletteras med sekvensanalys. Se mätområde under rubriken Spårbarhet.

MLPA non-alfa-lokus

SALSA® MLPA® kit P102 HBB version D1 detekterar variation i kopieantal i 39 olika sekvenser i HBB-regionen, nio referenssekvenser utanför HBB-regionen samt även detektion av HbS-mutationen. MLPA rekommenderas inte som enda analys för detektion av punktmutationer, resultatet måste alltid kompletteras med sekvensanalys. Se mätområde under rubriken Spårbarhet.

4.2 Spårbarhet

B-Hemoglobin och Erc-MCH

Var god se respektive analys.

B-HbA₂ och B-HbF

BioRad (HPLC): Hemoglobin A2/F Calibrator nr 2700018.

Referenssekvenser för de genetiska analyserna

Gen	Referenssekvens
HBA1	NG_000006.1
	NM_000558.5
	NP_000549.1
HBA2	NG_000006.1
	NM_000517.6
	NP_000508.1
HBB	NG_000007.3
	NM_000518.5
	NP_000509.1
HBD	NG_000007.3
	NM_000519.4

	NP_000510.1
HBG1	NG_000007.3
	NM_000559.3
	NP_000550.2
HBG2	NG_000007.3
	NM_000184.3
	NP_000175.1

MLPA alfa-lokus och non-alfa-lokus

I tabellen anges det område i den kromosomala och i den genomiska referenssekvensen dit MLPA-prober binder.

Kitbeteckning	Referenssekvens	Mätområde
P140-C1 HBA	NC_000016.10	47 132 – 407 589
	NG_000006.1	4 528 – 42 067
P102-D1 HBB	NC_000011.10	4 602 141 – 5 390 135
	NG_000007.3	2 504 – 72 673

4.3 Mätosäkerhet

B-Hemoglobin och Erc-MCH

Var god se respektive analys.

B-HbA₂ och B-HbF

	HPLC		CE	
	CV (%)	Nivå (%)	CV (%)	Nivå (%)
HbF	5	~ 2,0	2	~ 27
HbF	2	~ 9,0		
HbA ₂	3	~ 3,0	3	~ 2,6
HbA ₂	3	~ 6,0	3	~ 6,0
HbS	2	~ 29	2	~ 17

Genetiska analyser

Ej tillämbart.

4.4 Ackreditering

Följande metoder är ackrediterade	Följande metoder är inte ackrediterade
B-Hemoglobin (Hb)	DNA-HBD, sekvens
Erc-MCH	DNA-HBG1 och HBG2, sekvens
B-HbA ₂ och B-HbF med HPLC	DNA-HB alfa-gel
B-HbA ₂ och B-HbF med kapillärelektrofores	DNA-HB-NGS
DNA-HBA1 och HBA2, sekvens	
DNA-HBB, sekvens	
DNA-HB alfalokus, MLPA	
DNA-HB non-alfalokus, MLPA	

5 Referenser

1. Steinberg, M. H. ed, Disorders of hemoglobin, second edition, 2009
6. Bain, B.J., Hemoglobinopathy Diagnosis, second edition, 2006
7. Traeger-Synodinos et al, EMQN Best Practice Guidelines for molecular and haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies, European Journal of Human Genetics, 2015, 23, 426–437
8. Harteveld, C.L., α -thalassemia, Orphanet Journal of rare diseases, 2010, 5:13
9. Galanello, R., Beta-thalassemia, Orphanet Journal of rare diseases, 2010, 5:11
10. Databasen HbVar: <http://globin.bx.psu.edu/hbvar/menu.html>
11. Instruktion Devyser Thalassemia_CE-IVD_7-A042-EN_2021-10-19