

Nut van moleculaire diagnostiek bij α - en β -thalassemie

ASO Eveline Vancraeynest
Supervisor dr. H. Claerhout

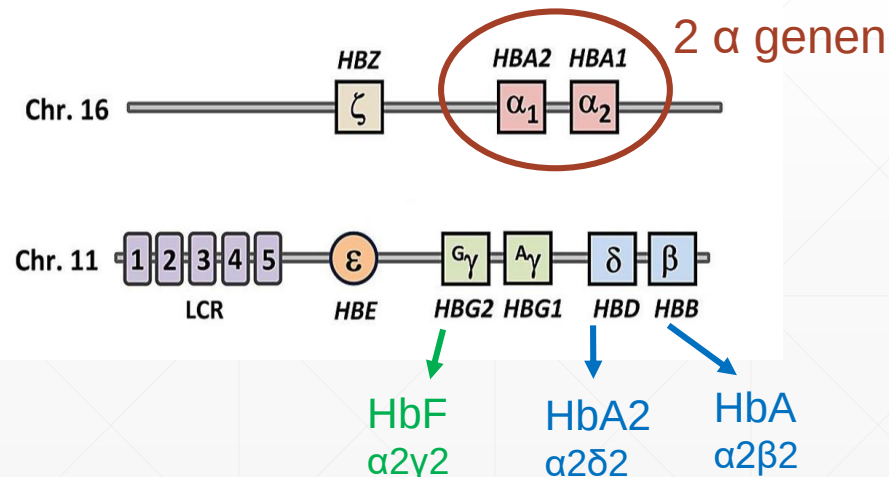
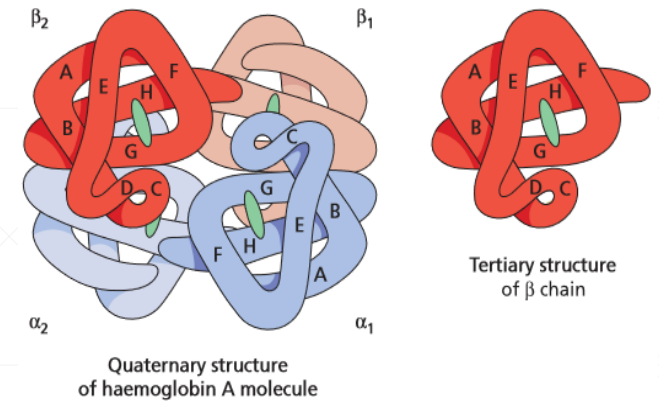
18 februari 2020

CAT: Nut van moleculaire diagnostiek bij α - en β -thalassemie

- **Inleiding**
 - **Vraagstelling / appraisal**
 1. Wat is de opbrengst van moleculaire diagnostiek bij vermoeden van α -thalassemie op basis van perifeer bloedbeeld en hemoglobine elektroforese?
 2. Welke technieken of combinatie van technieken worden momenteel gebruikt bij moleculaire diagnostiek voor β -thalassemie?
 3. In welke gevallen wordt er moleculaire diagnostiek uitgevoerd voor β -thalassemie?
 - **Besluit**
 - **To do / action**
-

Inleiding

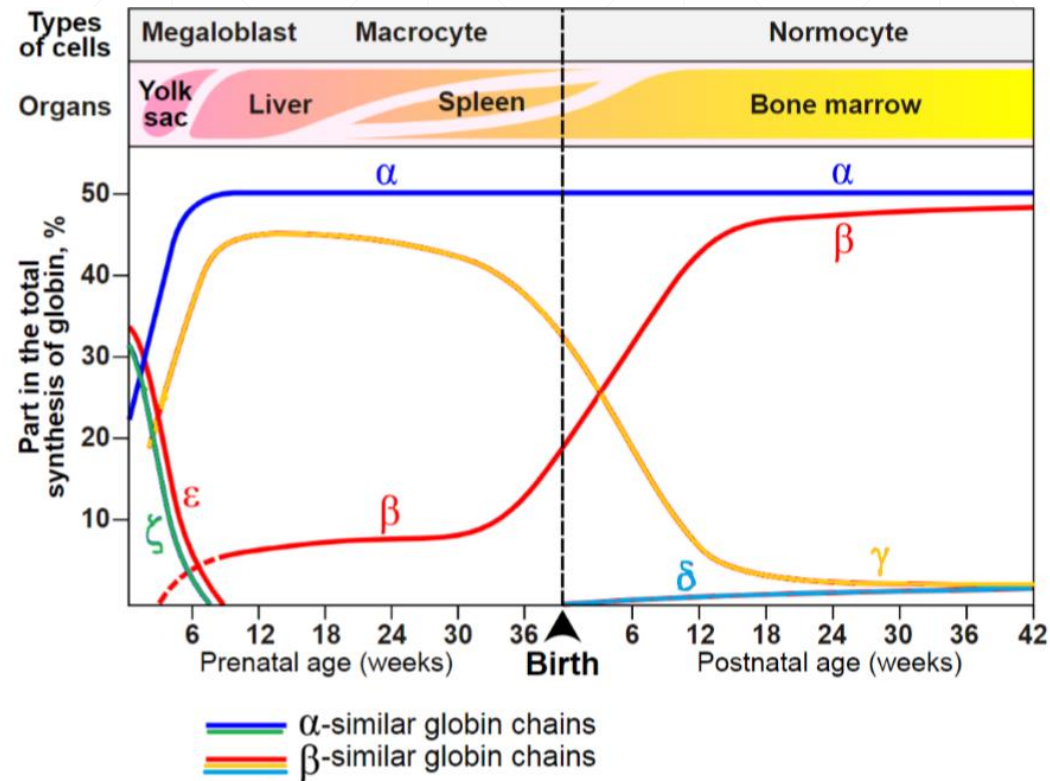
- Hemoglobine
 - Structuur
 - Tetrameer: 4 globine ketens en 4 heem groepen
 - Globine: 4 polypeptide ketens: 2 α -ketens en 2 niet- α -ketens (β , γ , δ)
 - Globine gen cluster



Inleiding

Normaal HB

- HbA 96,8-97,8%
- HbA2 2,2-3,2%
- HbF 0-0,5%



Postnatal genetics en.svg [<http://commons.wikimedia.org>]

Pathologie afhankelijk van aangetaste globine keten:

- α-defect

Pre- en postnatale expressie (foetus - snel na de geboorte)

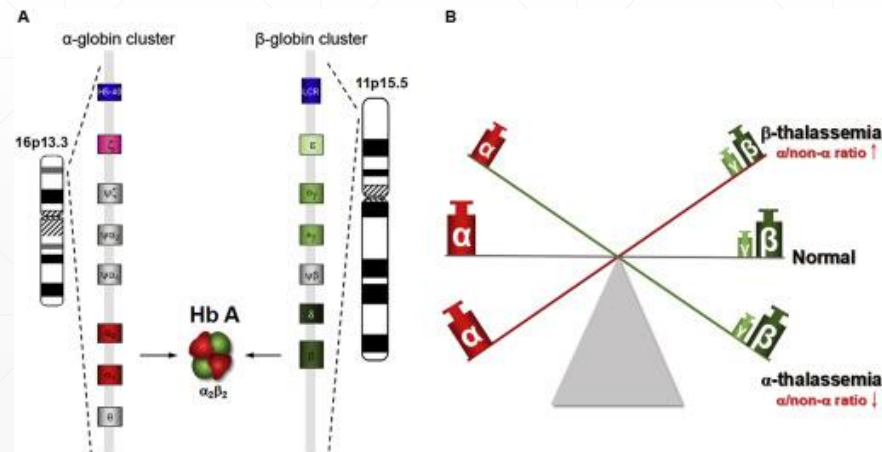
- β-defect

Postnatale expressie (vanaf 6 maanden)

Inleiding

- **Thalassemie**

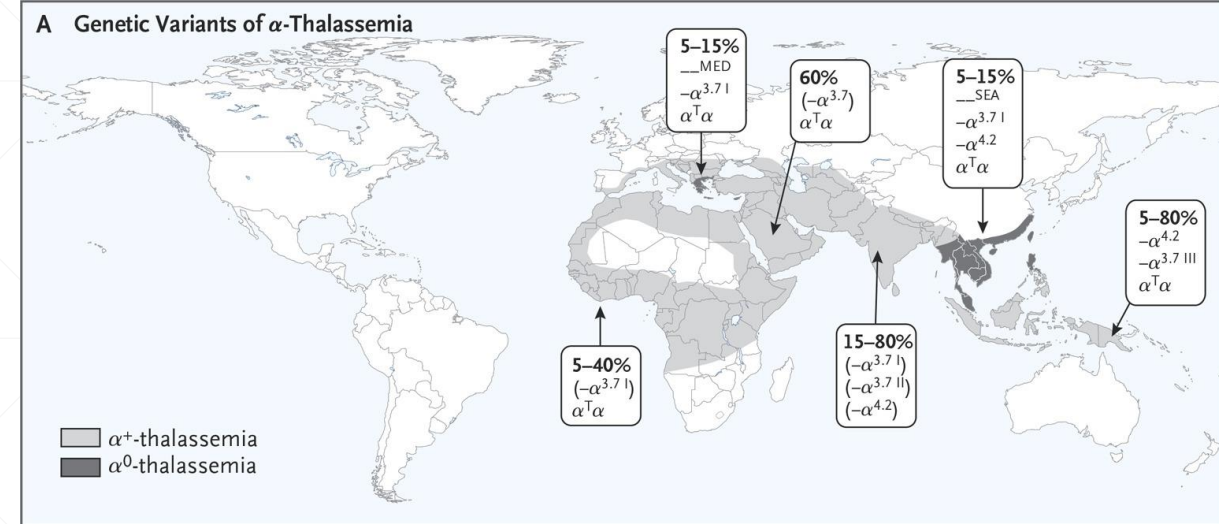
- WHO: 2,9% drager
- Kwantitatief defect – verstoorde globineketen productie
- Ongebalanceerde $\alpha\beta$ ratio
- Microcytair hypochroom bloedbeeld +/- anemie (niet altijd)



Shang X et al. Update in the genetics of thalassemia: What clinicians need to know. *Gynaecology* 2017;37:3-15.

Alfa-thalassemie

- Voornamelijk deleties
 - $-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$
 - --MED, $-(\alpha)^{20,5}$ (mediterraans) en --SEA, --FIL, --THAI
- Ook puntmutaties (Hb constant Spring)
- Hoge prevalentie in Afrika, Midden-Oosten, Zuid-Oost Azië en Middellands Zeegebied
- HbA2 gedaald
- Microcytaire hypochrome anemie



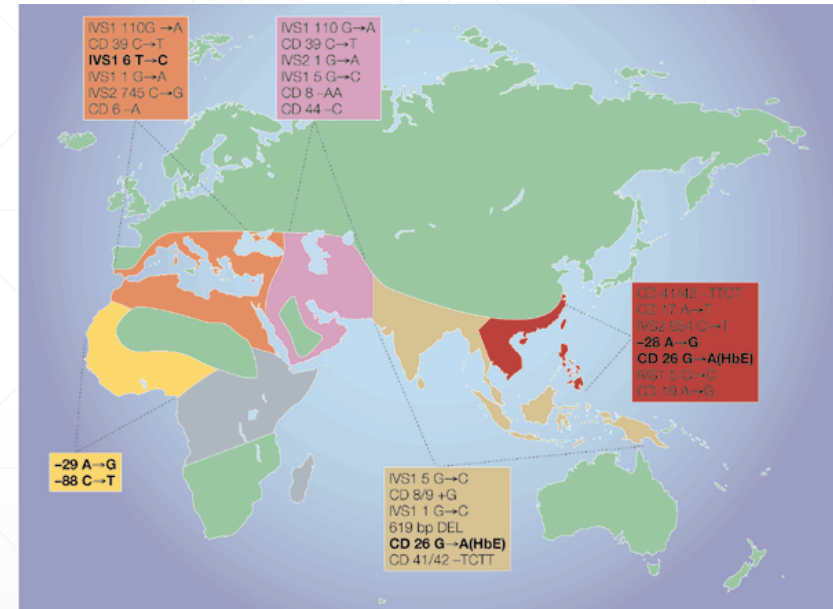
Piel FB and Weatherall DJ. The α -thalassemias. *N Engl J Med* 2014;371:1908-1916.

Alfa-thalassemie

Genotype	Fenotype	Bloedbeeld	Klinisch	Hb-elektroforese
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	Normaal	Hb nl, MCV nl	Geen symptomen	Normaal
$-\alpha/\alpha\alpha$ of $\alpha\alpha^{\text{ND}}/\alpha\alpha$	α^+ -thalassemie (heterozygoot) – ‘silent trait’	Nl tot licht $\downarrow$ MCV en MCH	Geen symptomen	HbA2 – HbF nl
$-\alpha/-\alpha$	α^+ -thalassemie (homozygoot) – ‘hemoglobine trait’	Hb nl tot $\downarrow$, MCV $\downarrow$, MCH $\downarrow$	Milde anemie	HbA2 nl tot licht $\downarrow$ – HbF nl
$--/\alpha\alpha$	α^0 -thalassemie (heterozygoot) – ‘hemoglobine trait’	Hb nl tot $\downarrow$, RBC $\uparrow$, MCV $\downarrow$, MCH $\downarrow$	Milde anemie	HbA2 < 2,5%
$--/-\alpha$	Hemoglobine H ziekte (HbH)	Hb $\downarrow$, MCV $\downarrow\downarrow$, MCH $\downarrow\downarrow$	Chronische hemolyse, splenomegalie	HbH 10-20%, HbA2 nl tot licht $\uparrow$
$--/--$	α -thalassemie major (homozygoot) – Hb Bart’s hydrops foetalis	Hb $\downarrow\downarrow$, MCV $\downarrow\downarrow$ MCV $\downarrow\downarrow\downarrow$, MCH $\downarrow\downarrow\downarrow$	Levensbedreigende foetale anemie, hydrops	Hb Bart’s 80-90% Hb Portland 10-20% HbH <1%

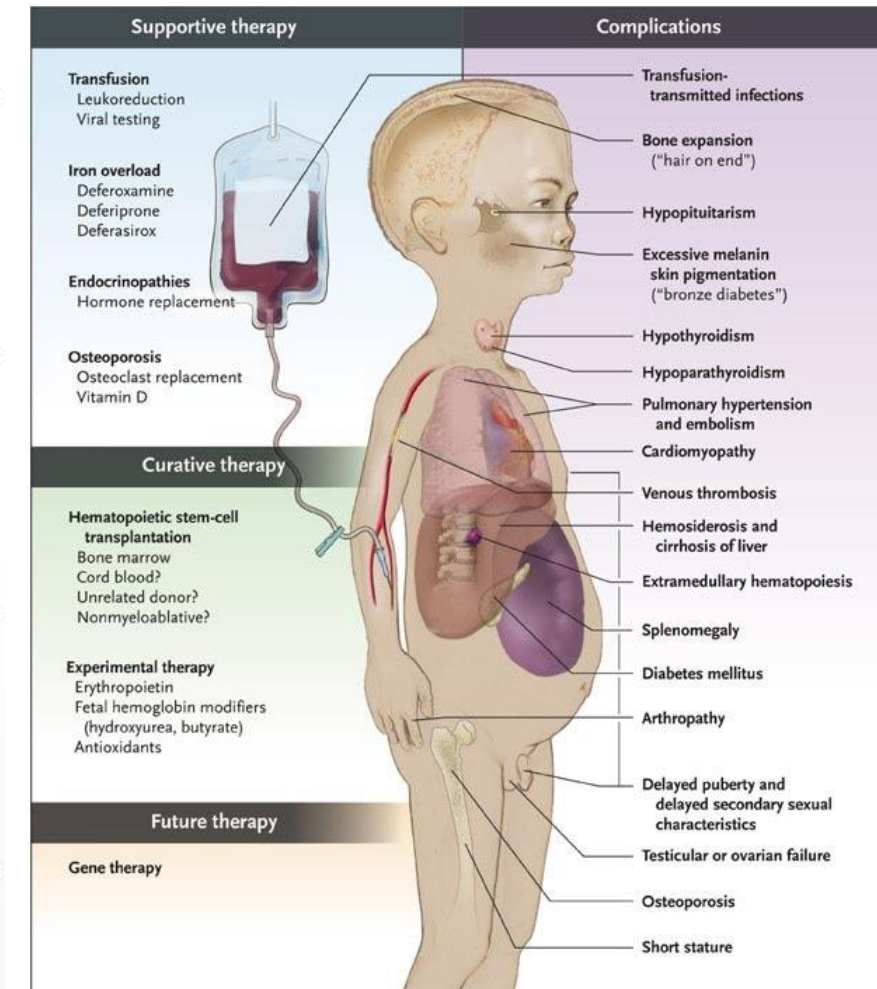
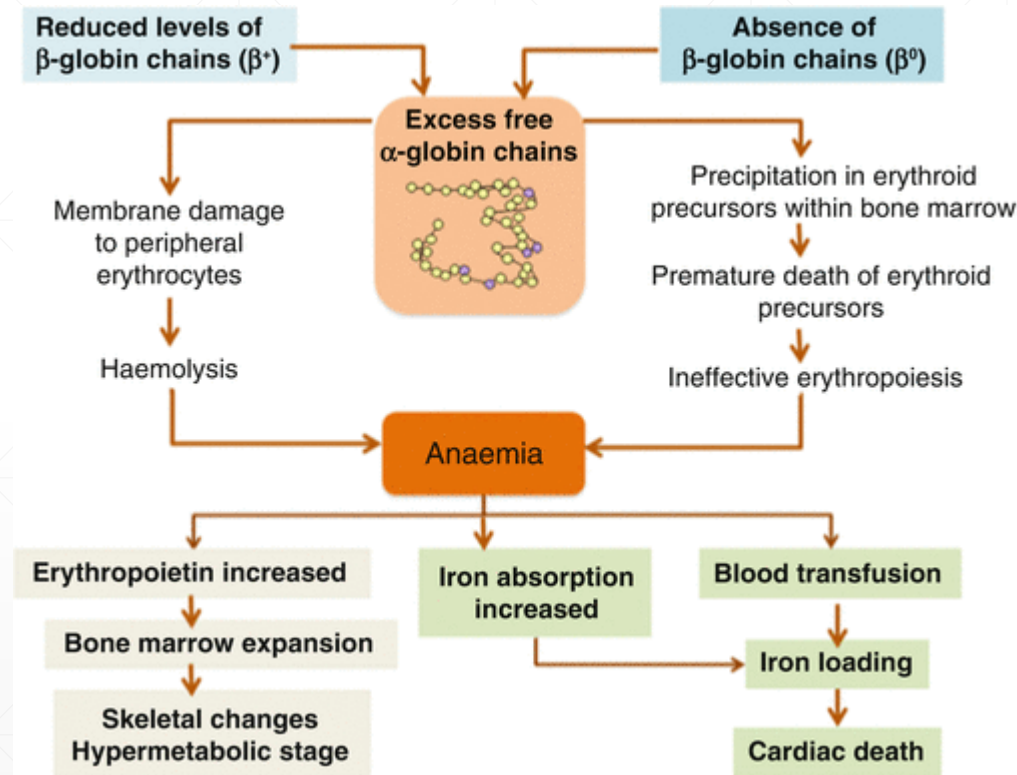
Beta-thalassemie

- Voornamelijk puntmutaties
- Hoge prevalentie in Afrika, ZO Azië, Middellandse zeegebied, Indisch subcontinent
- Gestegen HbA2
- Microcytaire hypochrome anemie



Weatherall D. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nature reviews genetics*, 2001, 2: 245-255.

Pathofysiologie van β -thalassemie



Beta-thalassemie

	β -thalassemie minor	β -thalassemie intermedia	β -thalassemie major (Cooley's anemie)
Overerving	Heterozygoot	Mild homozygoot of samengesteld heterozygoot	Homozygoot of samengesteld heterozygoot
Genotype	β^0 , β^+ , β^{++}	β^0/β^+ , β^+/β^+ , β^+/β^{++} , β^0/β^0 + beïnvloedende factoren	β^0/β^0 , β^+/β^0 , β^+/β^+
Leeftijd diagnose	$\pm$ 18 maanden	Heterogeen : 11% <1j, 33% 1-2j, 59% >2j	$\pm$ 3-6 maanden
Bloedbeeld	Milde microcytaire hypochrome anemie	Heterogeen: milde-matige anemie	Ernstige microcytaire hypochrome anemie Poikilocytose, target cells, erytroblasten Ernstige hemolyse
Klinisch	Geen symptomen	Heterogeen: geen tot ernstige symptomen Variabele transfusienood	Ernstig ziek (ijzeroverbelasting, multiorgaanfalen) Transfusienood
Hb-elektroforese	HbA2 > 3.2% HbF 0.5-6%	Variabel HbA2 HbF tot 100%	Variabel HbA2 HbF 70-90%

Laboratoriumdiagnose

▪ Indicaties

- Screening (pre-conceptioneel, antenataal, neonataal, pre-operatief)
- Afwijkend hematologisch bilan (suggestieve RBC parameters en/of morfologie)
- Kliniek

▪ Onderzoeken

▪ Eerstelijnsonderzoeken:

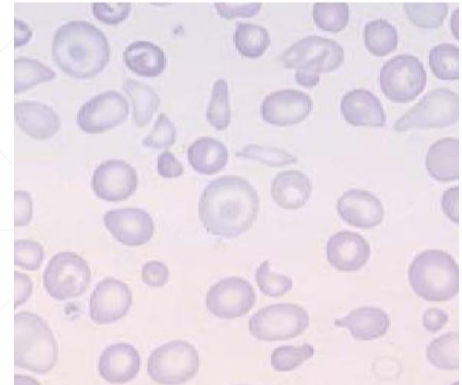
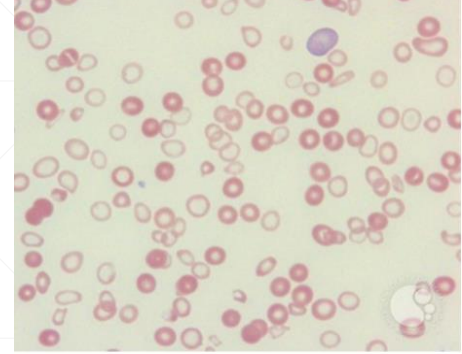
- Hb, RBC, MCV, MCH, RDW, ijzerstatus, (hemolyseparameters)
- Morfologie RBC
- Hemoglobine elektroforese
 - Capillaire zone elektroforese (CZE)
 - High pressure liquid chromatography (HPLC)

▪ Tweedelijnsonderzoeken:

- Sikkelceloplosbaarheidstest

Algemene interpretatie:

- HbA2 nl: α -thalassemie mogelijk als MCV en MCH ↓
- HbA2 ↓: α -thalassemie/ Fe-deficiëntie
- HbA2 ↑: β -thalassemie
- HbF ↑: HPFH of $\delta\beta$ -thalassemie



Laboratoriumdiagnose

- Derdelijnsonderzoeken:
 - Moleculaire diagnostiek
 - *α -thalassemie*: confirmatie (dd α^0 - en α^+ -thalassemie)
 - Deleties: (Multiplex) GAP-PCR, MLPA
 - Puntmutaties: PCR gebaseerde technieken (ARMS, Re-PCR, ...) of Sanger sequencing
 - *β -thalassemie*: **onderzoeksvraag 2 en 3**
-

Wat is de opbrengst van moleculaire diagnostiek bij vermoeden van α -thalassemie op basis van perifeer bloedbeeld en hemoglobine elektroforese?

- **Methode**

- Query LWS van **14-01-2014** tem **28-11-2018** van 165 patiënten waarbij MLPA werd verricht ikv α -thalassemie
 - Exclusie dubbele bepalingen en onvolledige gegevens, 2 patiënten $\leq 2j$ met HbS
 - **117 patiënten** (0-78j) waarvan **18 HbS**
-

Resultaten

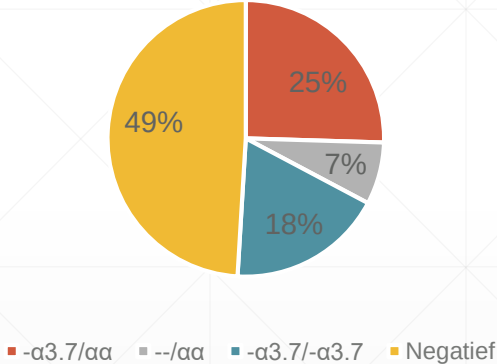
- Onderverdeling volgens HbA2 (exclusie HbS)

Totaal aantal patiënten: 99 (100%)		
α-thalassemie: 47 (47%)		
Normaal HbA2	Gedaald HbA2	Verhoogd HbA2
28 (59,5%)	13 (27,5%)	6 (13%)
Microcytair (MCV < 75-78 fL)		
18 (64%)	11 (85%)	4 (67%)
Ferriprief		
2 (11%)	1 (9%)	0 (0%)

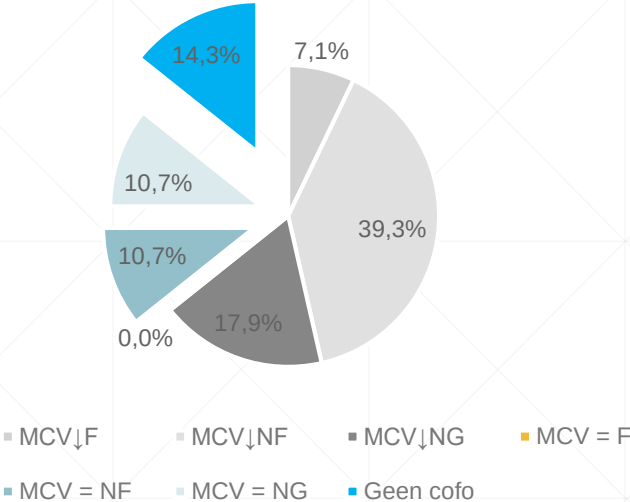
Resultaten

- Normaal HbA2: 55 patiënten

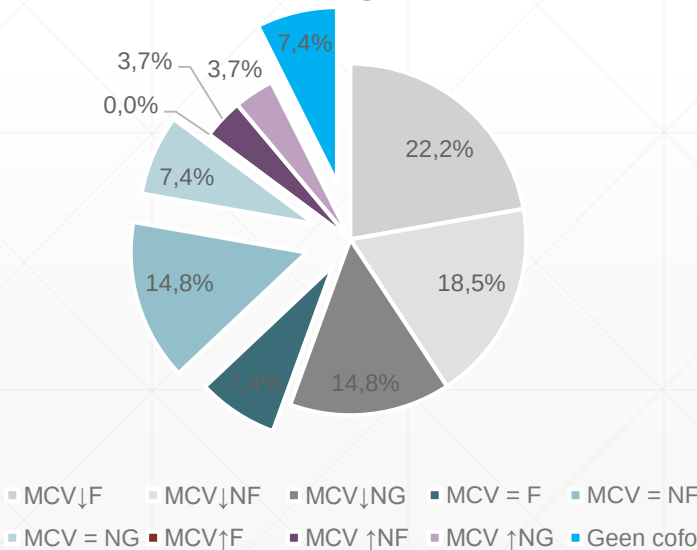
Normaal HbA2: MLPA



NI HbA2 en α-thalassemie



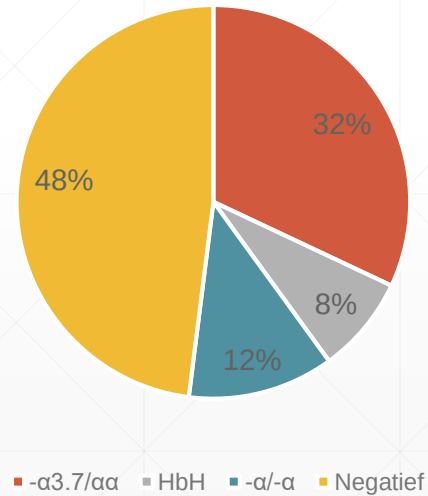
NI HbA2 en negatieve MLPA



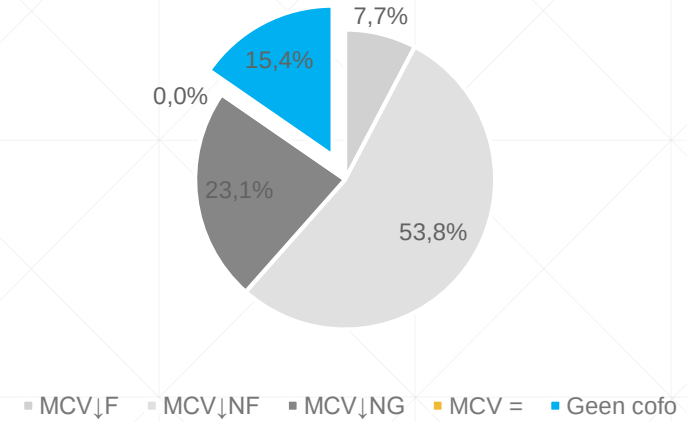
Resultaten

- Verlaagd HbA2: 25 patiënten

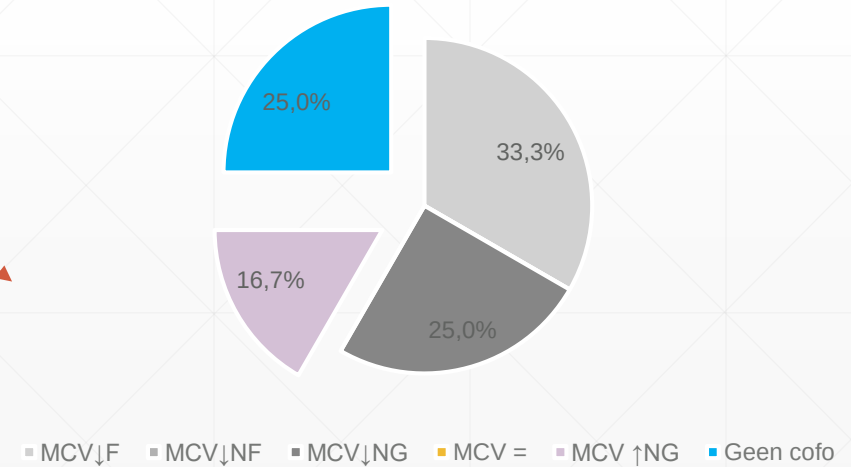
Verlaagd HbA2: MLPA



Verlaagd HbA2 en α-thalassemie



Verlaagd HbA2 en negatieve MLPA



Resultaten

- Moleculair onderzoek omwille van verlaagde waarden van een Hb variant en/of onverwacht microcytair bloedbeeld

Indien een onderliggende hemoglobine variant aanwezig is, kan HbA2 niet betrouwbaar worden geïnterpreteerd.

Andere indicaties voor MLPA 19/99 (19%)							
Resultaat MLPA	α-thalassemie: 6 (32%)			Negatief: 13 (68%)			
Onderliggende aandoening	Heterozygote E	Heterozygote C	Geen*	Heterozygote E	β-variant (Hb D)	Geen*	Homozygote E
Aantal	3 (50%)	2 (33%)	1 (17%)	5 (38,5%)	1 (8%)	5 (38,5%)	2 (15%)
Bereik waarden onderliggende HB	15.3-23.3%	26.2-29.1%	/	24.2-25.3%	32.5%	/	87.7-93.3%
MCV ↓	2 (67%)	2 (100%)	0 (0%)	4 (80%)	1 (100%)	5 (100%)	2 (100%)
MCV niet gekend	1 (33%)	/	1 (100%)	Geen anemie: 1 (20%)	/	/	/
Ferriprief	/	/	/	/	/	2	/
Niet ferriprief	2	2	/	3	/	1	1
Niet gekend	1	/	1	2	1	2	1

*Bij deze patiënten was er een vermoeden van onderliggende β-thalassemie (gestegen HbA2 en HbF).

Overzicht: 18
patiënten met
HbS

HbSS / HbAS	HbS (%)	Thalassemie	HbA2 (%)
HbAS	34.5	Heterozygote α+ thalassemia	3.2
HbAS	35.4	Heterozygote α+ thalassemia	3.4
HbAS	27.5	Homozygote α+ thalassemia	3.1
HbAS	27.4	Homozygote α+ thalassemia	3.6
HbAS	27.6	Homozygote α+ thalassemia	3.7
HbAS	26.5	Homozygote α+ thalassemia	3.7
HbAS	27.2	Homozygote α+ thalassemia	3.8
HbAS	28.2	Homozygote α+ thalassemia	3.8
HbAS	52.2	Negatief	2.7
HbAS	37.2	Negatief	3.1
HbAS	34.9	Negatief	2.4
HbSS	73.1	Heterozygote α+ thalassemia	2.3
HbSS	86	Heterozygote α+ thalassemia	3.8
HbSS	86.2	Homozygote α+ thalassemia	4.3
HbSS	79.4	Negatief	3.8
HbSS	71.1	Negatief	2.2
HbSS	72.1	Negatief	2.2
HbSS	68	Negatief	1.7

Resultaten HbS

Patiënten met **HbS** in combinatie met een onderliggende **α -thalassemie** hebben **statistisch significant hogere HbA2** (mediaan HbA2 = 3.6%) (**p=0.02**) ivm patiënten **zonder onderliggende α -thalassemie** (mediaan HbA2 = 2.4%).

HbA2 varieerde tussen **2.3-4.3%** (2.3-3.8% voor heterozygote en 3.1-4.3% voor homozygote α^+ thalassemie).

Van de patiënten met een **heterozygote HbS en α -thalassemie**, was het **HbS <35%**.

Besluit onderzoeksvraag 1

- **50%**(58/117): **α-thalassemie** obv MLPA.
 - α-thalassemie bij **25%**(25/99) van de patiënten met een ↓**HbA2** en bij **56%**(55/99) met een **normaal HbA2**.
 - Normaal HbA2: hoger % ferriprivie bij een microcytair bloedbeeld en een negatieve MLPA, itt tot wanneer de MLPA positief was.
 - ↓HbA2: ijzerstatus veelal niet gekend.
 - Onderliggende hemoglobine variant: HbA2 kan niet betrouwbaar worden geïnterpreteerd.
 - **HbS + onderliggende α-thalassemie**: *significant hogere HbA2 waarden (p=0.02)* ivm patiënten zonder onderliggende α-thalassemie.
-

Welke technieken of combinatie van technieken worden momenteel gebruikt bij moleculaire diagnostiek voor β -thalassemie?

- **β -thalassemie**

- 95% puntmutaties
- Zeldzaam deleties

Meestal eerst screening naar de meest voorkomende varianten dmv **PCR-gebaseerde technieken** => >90% van de varianten gedetecteerd



Zeldzame/nieuwe puntmutaties: **Sanger sequencing**

Zeldzame deleties: **MLPA**

Resultaten enquête

Enquête gericht aan 18 klinische laboratoria:

5 in België

13 in Nederland

Respons: 56%

	α -thalassemie		β -thalassemie	
	België	Nederland	België	Nederland
(multiplex) GAP-PCR	0	6	0	0
Sanger sequencing	1	4	1*	4
MLPA	2	4	1*	2
NGS	0	0	0	0
Uitbestede analyse	0	0	1	4

**Cliniques universitaires Saint-Luc UCL Bruxelles, België*

Moleculaire technieken

- **Puntmutaties**

- **Gekende varianten**

- PCR gebaseerde technieken:

- (multiplex) ARMS-PCR
 - Re-PCR
 - RT-PCR/qPCR
 - ALO-PCR
 - Reverse dot blot hybridization
 - DGGE
 - HRMA
 - Pyrosequencing

- **Ongekende varianten**

- Sanger sequencing
-

Moleculaire technieken

- **Deleties**

- **Gekende varianten**
 - (Multiplex) GAP-PCR

- **Ongekende varianten**

- MLPA
- Array-CGH

- **Puntmutaties en deleties**

- NGS



*Nog niet toegepast in de praktijk in
Nederland en België*

In welke gevallen wordt er moleculaire diagnostiek uitgevoerd voor β -thalassemie?

1. Prenatale diagnose

Antenatale/neonatale screening: richtlijnen **NHS** en **ENERCA**

Definitieve diagnose dmv moleculaire technieken => kennis van juiste *genotype* is belangrijk om correcte *genetische counseling* te kunnen verrichten en prenatale diagnostiek.

Interpretatie:

Hematologie

Biochemie

Moleculair

Familiaal

2. Onduidelijke diagnose met eerstelijnsonderzoeken

Diagnose heterozygote β -thalassemie: MCH <27pg, MCV <79fL en HbA2 >3,2%

⇒ Beïnvloeding door > factoren mogelijk:

- ⇒ Interpretatie obv biochemische en hematologische waarden niet altijd mogelijk.
- ⇒ moleculaire diagnostiek

⇒ Meest frequente beïnvloedende factoren:

- ⇒ Deleties in LCR van HBB locus
 - ⇒ 'Silent' of 'near silent' β -thalassemie dragers (borderline HbA2), KLF1 variant
-

2. Onduidelijke diagnose met eerstelijnsonderzoeken

❖ Deleties in LCR van HBB locus

- Deleties meestal thv HBB en HBD genen
- Zeldzaam in LCR van HBB => non-expressie van verbonden β -achtige globine genen => geen $\uparrow$ HbA2, HbF soms $\uparrow$



❖ 'Silent' of 'near silent' β -thalassemie dragers en KLF1 variant

- Sommige genetische variaties zijn geassocieerd met borderline HbA2
- Mutaties in KLF1 => activatie HBD gen => $\uparrow$ HbA2 ($3,2\% \pm 0,2\%$), MCV en MCH meestal normaal. (p.Ser270X = meest frequente mutatie)

Genetische variaties geassocieerd met normale/borderline HbA2 waarden

Variatie HGVS nomenclatuur	Variatie traditionele nomenclatuur	Hb (g/dl)	MCV (fL)
c.-151C>T	β -101 (C T)	13,5	88.5 $\pm$ 78
c.-142C>T	β -92 (C(T)	11,9 - 15,7	83.0 $\pm$ 6.0
c.-18C>G	β +33 (C(G)	10,6	82.0 $\pm$ 9.2
c.316-7C>G	β IVS2-844 (C G)	8,2	96.0 $\pm$ 4.0
c.-50A>C	Cap+1 (A(C)	-	23 - 26
c.92+6T>C	β IVS1-6 (T C)	9,55 - 14,35	71.0 $\pm$ 4.0
c.111A>G	-	10,7 - 14,3	71 - 78
c.110T>C	-	8,9 - 15	65 - 74
c.6C>G	β +1480 (C G)	14.3 - 14.9	88.3 $\pm$ 9.5
	aaa/aa	-	85.5 $\pm$ 7.8
	KLF1 varianten (29)	-	82.7 $\pm$ 5.7

Hematologische parameters	Mogelijke interpretatie
MCV < 79 fl, MCH < 27 pg, nl Hb, HPLC/CE, nl % HbA2 en HbF	ijzerdeficiëntie Heterozygote α -thalassemie Heterozygositeit voor milde β -thalassemie varianten (soms is HbA2 borderline verhoogd) Heterozygote δ -met β -thalassemie Heterozygote $\epsilon\gamma\delta\beta$ -thalassemie
NI/borderline $\downarrow$ RBC parameters met $\uparrow$ HbA2	Interactie van α - en β -thalassemie β -thalassemie dragers met foliumzuur of B12 deficiëntie of hepatitis
NI of $\downarrow$ RBC parameters met $\uparrow$ HbF (>5%) en nl of laag HbA2	Heterozygote $\delta\beta$ -thalassemie, $\Lambda\gamma\delta\beta$ -thalassemie of HPFH
Normale RBC parameters met normaal/borderline HbA2	Triplicatie van α -genen, KLF1 varianten, milde β -thalassemie variant
Ernstig $\downarrow$ RBC parameters en $\uparrow$ HbA2	Multiple α -globine genen (>4) en heterozygote β -thalassemie

Situaties waarin de hematologische parameters niet overeenkomen met een typische diagnose van β -thalassemie => moleculaire diagnostiek vereist.

3. Definitieve diagnose bij mogelijke dragers en gestegen HbA2

In de literatuur wordt soms de indicatie gesteld om moleculaire diagnostiek te verrichten bij een ↑ HbA2:

- ⇒ *Bevestiging* van de juiste diagnose + kennen onderliggende *genetische variatie*
 - ⇒ *Ernst* van het klinisch fenotype (vb. transfusie versus niet-transfusiedependent)
-

Besluit

1. Patiënten met een **HbS + onderliggende α -thalassemie**, hebben **statistisch significant hogere HbA2 waarden ($p=0.02$)** ivm patiënten zonder onderliggende α -thalassemie.
 2. Meestal eerst screening naar de meest voorkomende varianten dmv **PCR-gebaseerde technieken** (>90% van de varianten). Indien de ongekennde varianten niet worden gedetecteerd na verdere screening, dan kan **Sanger sequencing** worden verricht voor zeldzame/nieuwe puntmutaties en **MLPA** voor deleties.
 3. **Indicaties** voor moleculaire diagnostiek voor β -thalassemie zijn: ***prenatale diagnostiek, onduidelijke diagnose met eerstelijnsonderzoeken en definitieve diagnose bij mogelijke dragers en patiënten met $\uparrow$ HbA2.***
-

To do / action

- Bezoek aan het LUMC in Leiden voor exploratie van de aldaar verrichte moleculair diagnostische onderzoeken voor β -thalassemie.
 - Overleg met het centrum menselijk erfelijkheid van UZ Leuven om diagnostiek voor β -thalassemie zelf op te starten.
 - Validatie en opstart van moleculair onderzoek voor β -thalassemie in UZ Leuven.
-



Bedankt voor jullie aandacht!