

Laboratoriediagnostik av hemoglobinopatier

Introduktion

Hemoglobinopatier är en sammanfattande term för alla ärftliga tillstånd som leder till syntes av strukturellt abnormt hemoglobin och/eller minskad syntes av en globinkedja. Med talassemier avses specifikt de genvarianter som leder till minskad bildning av en globinkedja. Hemoglobin (Hb) är det protein som står för syrgastransporten i blodet. Det består av fyra subenheter, s.k. globinkedjor. Olika kombinationer av globinkedjor ger upphov till olika typer av hemoglobin. Vanligast hos vuxna är HbA0 som består av två α - och två β -kedjor ($\alpha_2\beta_2$). Hos vuxna ses också små mängder HbA2 ($\alpha_2\delta_2$, ca 2,5-3,5%) och HbF ($\alpha_2\gamma_2$, <1%). Alfa- och beta-talassemi är autosomt recessivt ärftliga sjukdomar orsakade av mutationer i α - respektive β -globingenerna som leder till minskad produktion av globinkedjorna. Mutationerna kan utgöras av punktmutationer (sekvensvarianter, SNV) eller stora deletioner (kopietsförändringar, CNV). Talassemibärarskap leder till att man får små och hemoglobinfattiga röda blodkroppar (lågt MCV och MCH). Ofta ses även lätt anemi. Symtomen vid talassemier beror på en obalans mellan mängden bildade globinkedjor där den icke-defekta globinkedjan bildas i överskott. Hos patienter som samtidigt har både alfa- och beta-talassemi minskar obalansen och symtomen blir ofta mildare och MCV och MCH mindre uttalat sänkta.

Mutationer i globinkedjorna kan också leda till ett strukturellt förändrat hemoglobin. Vissa hemoglobinvarianter kan ge upphov till allvarlig sjukdom, t ex HbS som i dubbel uppsättning eller i kombination med vissa andra hemoglobinopatier ger upphov till sicklecellanemi, medan andra helt saknar klinisk betydelse. Bärare av hemoglobinvarianter har ofta helt normalt Hb och MCV/MCH. Vid screening med enbart kontroll av Hb riskerar man alltså att missa talassemibärarskap som inte ger upphov till anemi och/eller bärarskap av sjukdomsalstrande hemoglobinvarianter.

Ursprungligen var talassemi mest förekommande i tropiska och subtropiska områden, framför allt runt Medelhavet, Mellanöstern, Arabiska halvön, Indien, södra Kina och Sydostasien, vilket anses bero på att talassemibärarskap utgör visst skydd mot malaria. Ökad migration från dessa områden har dock medfört att talassemi blivit vanligare i Sverige och andra länder utanför de ursprungliga områdena.

Beta-talassemier

Genen som kodar för β -globin (HBB) sitter på kromosom 11. Det finns två β -globingenkopior (alleler), en på varje kromosom. Ett stort antal punktmutationer (SNV) i β -globingenen finns beskrivna som leder antingen till reducerad (β^+) eller helt upphävd produktion (β^0) av β -globinkedjor. Beroende på vilken typ av genvariant som patienten bär samt om den förekommer i heterozygot eller homozygot uppsättning kan tre kliniska varianter urskiljas, beta-thalassemia minor, intermedia och major. Patienter med beta-thalassemia minor är vanligen heterozygota för en punktmutation och uppvisar mikrocytos och hypokromasi med eller utan mild anemi, medan patienter med beta-thalassemia major är homozygota eller sammansatt heterozygota för betatalassemiförändringar och utvecklar en grav transfusionskrävande anemi. Beta-thalassemia intermedia har en heterogen genetisk bakgrund (homozygoti för β^+ -mutationer eller sammansatt heterozygoti för β^+/β^0 -mutationer) med ett anemispektrum mellan minor och majorvarianterna, men normalt utan behov av regelbundna blodtransfusioner. Sammansatt heterozygoti för β^+/β^0 -talassemi och sammansatt heterozygoti för β -talassemi och vissa hemoglobinvarianter (HbE och Hb Lepore) ger också upphov till sjukdom som kliniskt är jämförbar med beta-thalassemia intermedia eller major.

Laboratoriediagnostik av hemoglobinopatier

Alfa-talassemier

α -globin kodas av två olika gener (HBA1 och HBA2) som är nästan identiska och sitter mycket nära varandra på kromosom 16. Vi har därför fyra α -globinalleler. Alfa-talassemi uppstår oftast till följd av stora deletioner i α -globingenerna (CNV), även om det också finns punktmutationer (SNV) som kan påverka uttrycket av α -globingener och som kan leda till något allvarligare fenotyp än de som involverar deletioner. En deletion kan påverka ena eller båda α -globingenerna på samma kromosom. De vanligaste singelgengedeletionerna (α^+) som påträffas i Sverige är $-\alpha 3.7$ och $-\alpha 4.2$. De vanligast förekommande tvågensdeletionerna (α^0) i Sverige är --SEA (South East Asia) och --MED (Mediterranean). Beroende på antalet fungerande alleler kan alfa-talassemier beskrivas enligt tabell 1. Tysta bärare (som har tre fungerande alleler) är vanligen helt symtomfria och personer med alfa-thalassemia minor (som har två fungerande alleler) har sänkt MCV/MCH med eller utan mild anemi. Patienter med HbH-sjukdom, som endast har en fungerande α -genallel, har en måttlig till uttalad anemi men är oftast inte transfusionsberoende. Den allvarligaste formen av alfa-talassemi där alla fyra α -genallelerna saknas, Hb Barts hydrops fetalis, är inte förenlig med liv.

Tabell 1.

Variant	Fungerande alleler	Genotyp	Fenotyp	MCV/MCH	Klinisk bild
Normal	4	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	Normal	90 +/- 5 29,5 +/- 4	Normal
Tyst bärare	3	$-\alpha/\alpha\alpha$	Alfaplus(α^+)-talassemi (heterozygot)	81 +/- 7 26 +/- 5	Asymtomatisk
α -thalassemia minor	2	$-\alpha/-\alpha$	Alfaplus(α^+)-talassemi (homozygot)	69 +/- 4 23 +/- 2	Mild mikrocytär, hypokrom anemi
α -thalassemia minor	2	$--/\alpha\alpha$	Alfanoll(α^0)-talassemi (heterozygot)	69 +/- 4 22 +/- 3	Mild mikrocytär, hypokrom anemi
HbH-sjukdom	1	$--/-\alpha$	HbH-sjukdom	65 +/- 7 19 +/- 5	Måttlig/uttalad mikrocytär anemi
Hb Barts Hydrops fetalis	0	$--/--$	Alfatalassemia major (homozygot)	110/120	Död in utero/neonatalt

Det finns genetiskt två former av alfa-thalassemia minor, homozygot alfa⁺-talassemi där en α -globinallel saknas på varje kromosom och heterozygot alfa⁰-talassemi där båda α -globinallelerna saknas på samma kromosom. De två formerna har genetisk betydelse men inte klinisk. Det är bara alfa⁰-talassemibärarskap som kan ge upphov till Hb Barts hydrops fetalis om den ärvs från båda föräldrarna.

Laboratoriediagnostik av hemoglobinopatier

Genotypning av HBA1 och HBA2 är nödvändigt för korrekt diagnos och behövs för genetisk vägledning och ev prenataldiagnostik. Alfa⁰-talassemier förekommer framför allt i Kina, Sydostasien (Thailand, Taiwan, Kambodja, Laos, Vietnam, Burma, Malaysia, Singapore, Indonesien, Filippinerna), Cypern, Grekland, Sardinien och Turkiet. I de allra flesta fall har personer med alfa⁰-bärarskap MCH <25 pg, men det kan inte helt uteslutas vid högre MCH.

Sicklecellanemi och andra hemoglobinvarianter

Patienter med sicklecellanemi är homozygota för en punktmutation i HBB-genen (HbS) som gör att hemoglobinet i erythrocyterna kan polymerisera, framför allt vid låg syrgastension. Detta leder till förkortad överlevnad av röda blodkroppar (hemolytisk anemi) och episoder av försämrad blodcirkulation och tilltäppning av blodkärlen (vaso-ocklusion). Sicklecellsjukdom kan även uppkomma om man har HbS i enkel upplaga (heterozygoti för HbS) i kombination med bärarskap för beta-talassemi eller vissa andra hemoglobinvarianter (figur 1). Bärare av Hb S har i allmänhet normalt Hb och MCV/MCH. Sänkt MCV/MCH kan tala för samtidig järnbrist eller alfatalassemi.

HbE beror också på en punktmutation i HBB och är en hemoglobinvariant med nedsatt syntes, dvs en kombination av hemoglobinvariant och talassemi. Tillsammans med betatalassemianlag ger HbE upphov till thalassemia intermedia eller major.

Det finns också hemoglobinvarianter som t ex leder till ändrad syrgasaffinitet eller helt saknar klinisk betydelse.

Utredning

Indikationer för utredning av misstänkt talassemi eller hemoglobinopati är mikrocytär, hypokrom anemi utan järnbrist, känd talassemi eller hemoglobinopati i släkten eller hos partnern, eller familjeursprung från riskområde för hemoglobinopatier. Den basala utredningen bör omfatta analys av blodstatus (Hb, EPK, MCV, MCH och retikulocyter) och järnstatus. Normalt eller högt MCV/MCH talar emot talassemi, men utesluter inte tyst bärarskap av alfa-talassemi eller bärarskap för sicklecellanemi och andra potentiellt sjukdomsalstrande hemoglobinvarianter. Järnbrist är den vanligaste orsaken till mikrocytär, hypokrom anemi och bör därför uteslutas eller behandlas före talassemiutredning. Ett undantag är gravida kvinnor med risk för alfanoll-talassemi, dvs med MCH <25, där utredning och behandling av järnbrist inte ska fördröja talassemiutredningen (se separat rubrik nedan).

Nästa steg är analys av fraktionerade hemoglobiner. Analysen utförs på laboratoriet för klinisk kemi med en kromatografisk metod (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Metoden är framför allt av stor vikt för korrekt diagnostik av beta-talassemi, HbH-sjukdom och hemoglobinvarianter t ex HbS. Hemoglobinfördelning med ökad andel HbA2 (≥4%) i kombination med lågt MCH är diagnostiskt för beta-talassemi bärarskap. Däremot är analysen av mindre värde för diagnostik av alfa-thalassemia minor och tyst bärarskap av alfa-talassemi. Förutom ospecifika fynd, såsom en låg andel HbA2, är hemoglobinfördelningen helt normal. Misstanke om alfa-talassemi bärarskap grundar sig i första hand på lågt MCV/MCH i avsaknad av järnbrist och familjeursprung från högriskområde, men för säker diagnos krävs genanalys.

För att konfirmera diagnos behövs i vissa fall diagnostiken kompletteras med genanalys.

Laboratoriediagnostik av hemoglobinopatier

Genanalys (analys NGS hemoglobinopati) bör utföras i följande situationer:

- Om alfa-noll-talassemi inte kan uteslutas (MCH <25 och järnbrist uteslutits el MCH <25 och gravid)
- Misstänkt men inte säker beta-talassemi (MCH <27, HbA2 över referensintervall – 3,9%)
- Bärarskap av beta-talassemi (MCH <27, HbA2 ≥4%) och genetisk vägledning/fosterdiagnostik kan bli aktuellt
- Beta-thalassemia intermedia el major
- Förekomst av hemoglobinvariant (t ex HbS, HbE)
- Misstänkt HbH-sjukdom
- Klinisk misstanke om variant som inte syns på kromatogram

Genanalys kan också vara av värde i följande situationer:

- Om alfa-plus-talassemi inte kan uteslutas (MCH 25-26 och järnbrist uteslutits el MCH 25-26 och gravid)
- Bärarskap beta-talassemi (MCH <27, HbA2 ≥4%)

Genanalys NGS hemoglobinopati kan utföras på befintligt provmaterial från Hb-fraktionering om kontakt tas med laboratoriet på telefonnummer 031-3424077 inom två månader. För snabbare handläggning kan genanalys beställas direkt på remissen.

Analysen utförs på sektionen för genanalys, Klinisk Genetik och Genomik, och baseras på riktad amplikonsekvensering med NGS-teknik (Next Generation Sequencing) av alfaglobinregionen på kromosom 16 och betaglobinregionen på kromosom 11. Både alfaglobinregionen och betaglobinregionen analyseras på samtliga patienter oavsett frågeställning. Metoden kan påvisa sekvensvarianter (SNV) i form av punktmutationer och mindre insertioner och deletioner, samt kopietalsvariationer (CNV) som större deletioner, duplikationer och fusionsgener. Kopietalsneutrala mutationer i form av samtidig deletion och duplikation kan inte påvisas med använd metod.

Hemoglobinopatiutredning vid graviditet

Vid hemoglobinfördelning som ger misstanke om beta-talassemi bärarskap, sicklecell-bärarskap eller annan potentiellt sjukdomsalstrande hemoglobinvariant rekommenderas att fyndet konfirmeras med genanalys (NGS hemoglobinopati). Dessutom bör barnets far snarast testas med analys av fraktionerade hemoglobiner. De kombinationer av talassemier/hemoglobinvarianter hos föräldrarna som kan ge upphov till allvarlig sjukdom hos barnet framgår av figur 1 och förslag till flödesschema för utredning av gravida visas i figur 2.

Vid möjligt alfa⁰-talassemi bärarskap (normalt/sänkt HbA2 och MCH <25) rekommenderas vidare utredning med genanalys samt test av fadern (Hb och erythrocytindices) direkt utan att invänta utredning/behandling av ev järnbrist, för att inte förlora tid om fosterdiagnostik kan bli aktuellt. Eftersom alfa⁰-bärarskap inte helt kan uteslutas vid MCH 25-26, kan det även i dessa fall vara av värde att testa barnets far med Hb och erythrocytindices, framför allt om båda föräldrarna härstammar från

Laboratoriediagnostik av hemoglobinopatier

högriskområde för alfa⁰-talassemi. Om MCV/MCH inte är sänkta, det vill säga 80 fL/27 pg eller högre, så är partnern med all sannolikhet inte bärare av beta- eller alfa⁰-talassemi.

Vid graviditet där båda föräldrarna är bärare av talassemi och/eller hemoglobinopati rekommenderas kontakt med klinisk genetik för genetisk vägledning och eventuell fosterdiagnostik. Inför fosterdiagnostik behöver genanalys vara utförd på båda föräldrarna.

Sammanfattning och beställning av hemoglobinopatiutredning

Adekvat utredning av hemoglobinopatier behöver alltid innefatta Hb och erythrocytindex för att rätt kunna definiera typen och graden av anemi och är dessutom viktiga för att korrekt kunna tolka hemoglobinfördelningen samt för att kunna avgöra om kompletterande genotypning är nödvändigt eller inte. Vid beställning av fraktionerade hemoglobiner analyseras därför alltid Hb, EPK, MCV, MCH. För att underlätta tolkningen av fraktionerade hemoglobiner bör remissen även innehålla uppgifter om ev graviditet och graviditetsvecka, järnstatus, familjeursprung, känd hereditet, och vid partnertestning även personnummer på den gravida kvinnan.

Användning/indikation

- Utredning av mikrocytär, hypokrom anemi utan järnbrist.
- Känd talassemi eller hemoglobinopati i släkten eller hos partnern.
- Familjeursprung från riskområde för hemoglobinopatier.

Provinformation

Analysnamn: Hb(B)-hemoglobinfrak

Synonymer i labbutbud: Hemoglobinopatiutredning, fraktionerade hemoglobiner, talassemiutredning

Remiss:

Remiss Klinisk kemi 4 hematologi

Provtagning:

5 ml K₂-EDTA-rör med ca 3 ml blod.

Kontaktpersoner vid laboratoriet

Diagnostisk masspektrometri och kromatografi: tel 031-342 40 77

Sektionen för genanalys: tel 031-342 78 91

Medicinska frågor: Sofia Grund, överläkare

Författare

Sofia Grund

Referenser

Bain, B (2020). Haemoglobinopathy diagnosis. 3:e uppl. Blackwell Publishing.

Hartveld, LH and Higgs, DR. α -thalassemia. Review. Orphanet Journal of Rare Diseases 2010; 5:13.

A Database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemia mutations: HbVar

<http://globin.bx.psu.edu/hbvar/menu.html>

Guidance Antenatal screening NHS England (2022) [Antenatal screening - GOV.UK \(www.gov.uk\)](https://www.gov.uk/government/guidance/antenatal-screening)

Laboratoriediagnostik av hemoglobinopatier

Figur 1.

Bärare av	α^+ tal	α^0 tal	Hb S	β tal	$\delta\beta$ tal	Hb Lepore	Hb E	Hb O-Arab	Hb C	Hb D-Los Angeles	HPFH	Inte bärare
α^+ tal												
α^0 tal												
Hb S												
β tal												
$\delta\beta$ tal												
Hb Lepore												
Hb E												
Hb O-Arab												
Hb C												
Hb D-Los Angeles												
HPFH												
Inte bärare												

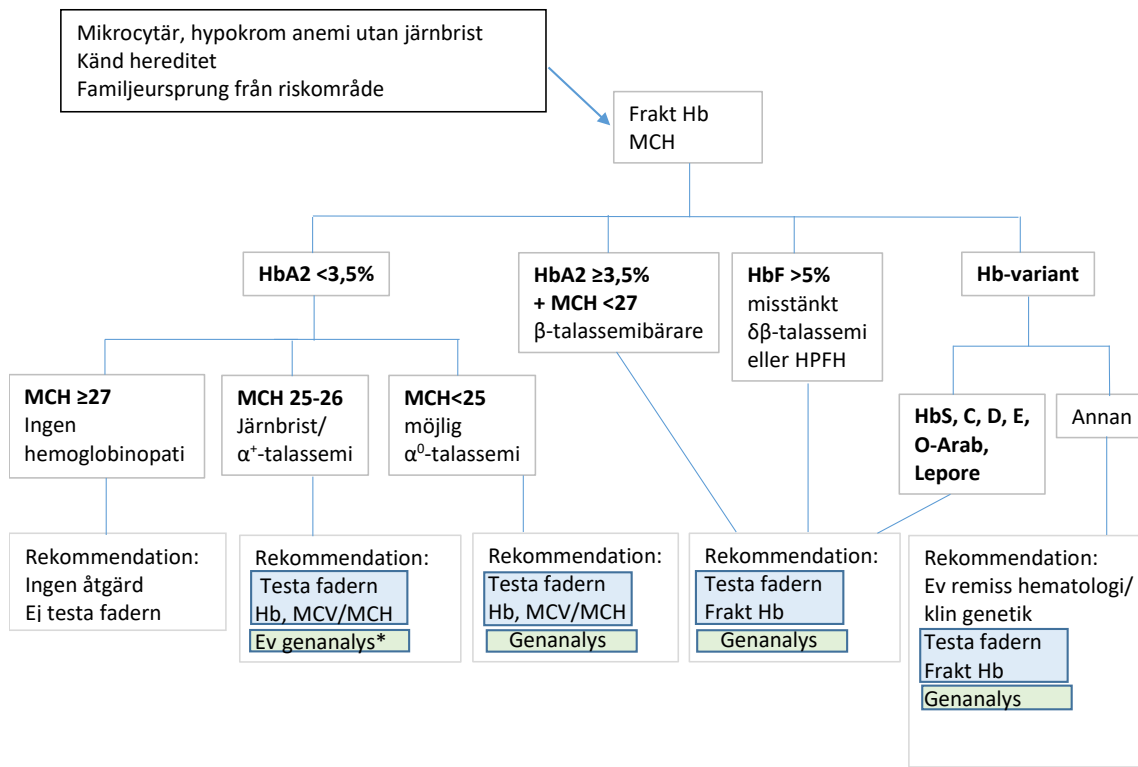
Kombinationer av talassemier/hemoglobinvarianter som kan ge upphov till allvarlig sjukdom

	Allvarlig risk
	Mindre allvarlig risk
	Möjlig dold risk alfa0-tal
	Ingen risk

Laboratoriediagnostik av hemoglobinopatier

Figur 2.

Flödesschema för utredning av misstänkt hemoglobinopati/talassemi hos gravida



*Om ej järnbrist