

Hemoglobinopatilere Laboratuvar Yaklaşımı

Dr. Çağatay Kundak

DÜZEN LABORATUVARLAR GRUBU

- 1949 yılında Orak Hücre Anemisi olan hastalarda elektroforetik olarak farklı bir hemoglobin tipi tanımlanmıştır.

- Bir tek proteindeki moleküler varyasyonun bir hastalığı karakterize edecek tüm klinik, laboratuvar ve patolojik bulgulardan sorumlu olabileceği bir moleküler hastalık konsepti ortaya çıkmıştır.

- **Hb A** ($\alpha_2\beta_2$). Normal erişkin hemoglobini (%94-98)
- **Hb F** ($\alpha_2\gamma_2$). Fetüs ve yenidoğanın majör hemoglobini. 2 yıl bittikten sonra normal çocuklarda % 2'nin altına inmelidir.
- **Hb A₂** ($\alpha_2\delta_2$). Normal erişkin hemoglobininin % 1.5 – 3.5'idir.

Hemoglobin Varyantları

Hemoglobin varyantları alfabenin harfleri veya tanımlandıkları coğrafik bölge ismi ya da her ikisi ile birlikte adlandırılırlar. Polipeptid zincirinde hangi aminoasitte anormallik varsa zincir sembolünün üzerine pozisyonu ve yerine gelen aminoasidin kısaltması yazılır.

Örn: **Hb S** = $\alpha_2\beta_2^{6\text{Val}}$

Hemoglobinopatiler ve Talasemiler genetik açıdan iki farklı hastalık grubu olsalar da her ikisi de klinik olarak ciddiyeti ve patofizyolojisi değişken olan ANEMİ ile karakterizedirler.

Talasemi ve Hemoglobinopati Tanısında Kullanılan Testler

- Tam Kan Sayımı
- Elektroforez
- HbH inklüzyon cisimleri
- IEF (Alkali elektroforez ile aynı paternde göç ederler ancak rezolüsyon çok iyidir ve daha güvenilir bir kantifikasyon vardır)
- Kapiller IEF (Kapiller EF + HPLC)
- HPLC
- DNA Analizi

Tam Kan Sayımı

- MCV (< 72 fl)
- RDW (normal)
- RBC (artmış)
- Hemoglobin (azalmış)

Elektroforez

- Geleneksel olarak elektroforez, varyant hemoglobinlerin tanımlanması ve kantifikasyonu için tercih edilen bir metottur.
- İki ayrı pH değerinde Agaroz jel kullanılarak yapılır.
- Yavaş ve emek yoğun bir yöntemdir.

Alkali Hb Elektroforezi

(pH: 8.6)

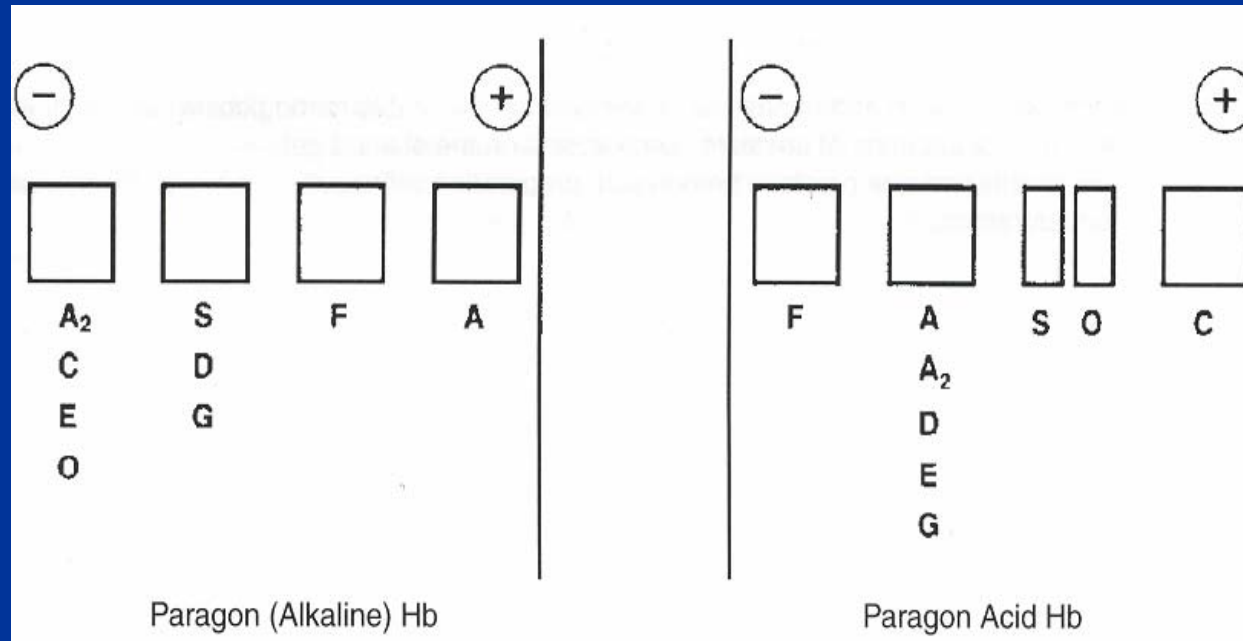
- Hb A, F, S ve C için tarama amaçlı kullanılır.
- Minör varyant olan G ve D'yi HbS'den ayıramaz.
- Minör varyant olan E ve O'yu HbC'den ayıramaz.
- CDC bu yöntem ile HbF ve HbA₂'nin dansitometrik taranmasını (kantifikasyon için) önermemektedir.
- HbH ve HbBart's gibi hızlı hemoglobinler için sensitivitesi düşüktür.

Asit Hb Elektroforezi

(pH:6.0)

- HbG ve HbD'nin HbS'den ayrılmasına olanak sağlar.
- HbE, HbO ve HbC'nin birbirlerinden ayrılmasına olanak sağlar.
- Hemolizat iyi yıkanmamış hücrelerden elde edilirse Albumin HbS ile aynı bölgeye göç eder.

Hemoglobin Elektrozofrezinde Bařlıca Hemoglobinlerin g etme Paternleri



HPLC

- Özellikle HbA₂ ve HbF'i ayırmak ve yüzde olarak miktarlarını belirtmek için tasarlanmış, aynı zamanda anormal hemoglobinlerin de kalitatif tespitlerini yapabilecek tam otomatik HPLC sistemleri mevcuttur.
- En sık rastlanan hemoglobin varyantları D, S, C ve E'dir. D, S ve C kendi adları ile anılan pencerelerde elüe olurlar. HbE, HbA₂ ile birlikte elüe olur.

HPLC Analit Tanımlama Pencereleeri

Table 2.
Analyte Identification Windows.

Note: Table 2 is provided as an example. Refer to current method parameters for lot specific information.

Analyte Name	Retention Time (minutes)	Band (minutes)	Window (minutes)
F	1.10	0.12	0.98-1.22
P2 [†]	1.39	0.11	1.28-1.50
P3 [†]	1.70	0.20	1.50-1.90
A ₀	2.50	0.60	1.90-3.10
A ₂	3.60	0.30	3.30-3.90
D-WINDOW	4.10	0.20	3.90-4.302
S-WINDOW	4.50	0.20	4.30-4.70
C-WINDOW	5.10	0.20	4.9-5.3

[†] P2 and P3 are minor peaks associated with hemoglobin A.

HPLC Yönteminin Kısıtlamaları

- Yüksek HbA₂ düzeyi, eşlik eden bir demir eksikliği anemisi tarafından maskelenebilir.
- HbS ve diğer geç elüe olan hemoglobin varyantları HbA₂ ile birlikte elüe olan minör komponentler içerirler. Bu durum HbA₂ düzeyinde sahte bir yüksekliğe yol açabilir.
- HbE, HbG ve Hemoglobin Lepore gibi nadiren HbD'nin de HbA₂ ile birlikte elüe oldukları görülmüştür. %10'u aşan HbA₂ oranlarında muhtemel varyant hemoglobin varlığı için diğer incelemeler yapılmalıdır.
- Hb Bart ve Hb H analiz başlamadan önce elüe olurlar. Bu nedenle kantifiye edilmeleri zordur.
- Diabetik örneklerde tipik olarak P2 piki yüksektir. HbF ile P2 arasında ilave bir unknown pik de görülebilir. Bu pikin hatalı olarak HbF'e dahil olmamasına dikkat etmek gerekir.

Beta Talasemi

- Heterozigot beta talasemi durumlarında HPLC ile bakıldığında HbA₂ %4-9 arasındadır. Hastaların %30-40'ında >%1 HbF vardır. (*%3.5-%4.0 arasındaki HbA₂ değerleri mutlaka hastanın kan sayımı sonuçları, klinik bulguları ve aile hikayesi ile birlikte değerlendirilmelidir*)
- Homozigot durumlarda normal ya da artmış HbA₂'nin yanısıra HbF %80-100 arasında görülür.

Beta Talasemi

- Beta Talasemi sıklıkla heterozigot olarak **Beta Talasemi Minor** (trait) olarak görülür.
- Beta talasemi geni taşıyıcıları hafif anemik oldukları gibi asemptomatik de olabilirler. Heterozigot çiftlerden doğacak çocukların homozigot beta talasemi genine sahip olma riskleri vardır.
- Homozigot formu olan **Beta talasemi majör**, yeterli tedavisi olmayan ölümcül bir hastalıktır. Ciddi anemi, sarılık, splenomegali, kemik malformasyonları, büyüme geriliği görülür ve genellikle erişkin yaşa ulaşmadan kaybedilirler.

β -Talasemi ve Herediter F Persistansı durumlarında görülen Hb oranları

	HbA ₂	HbF
Heterozigot β -Talasemi	% 4 - 9	% 1 - 5
Homozigot β -Talasemi	Normal ya da yüksek	% 80 - 100
Heterozigot HPFH	< % 1.5	% 10 - 20
Homozigot HPFH	yok	% 100

Beta Talasemi Sendromları

Beta-Talasemiler			
SENDROM	GENOTİP	KLİNİK ÖZELLİKLER	HEMOGLOBİN ÇALIŞMALARI
Homozigot durumlar:			
β^+ -Talasemi	β^+/β^+	Talasemi Majör/Intermedia	↓ Hb A, ↑ Hb F, değişken Hb A ₂
β^0 -Talasemi	β^0/β^0	Talasemi Majör	Hb A yok, değişken Hb A ₂ kalanın tümü Hb F
$\delta\beta^0$ -Talasemi	$\delta\beta^0/\delta\beta^0$	Talasemi Intermedia	Hb A ve A ₂ yok, %100 Hb F
Hb Lepore	Lepore/Lepore	Talasemi Majör	Hb A ve A ₂ yok, %75 Hb F, %25 Hb Lepore
Heterozigot durumlar:			
β^+ -Talasemi	β^+/β	Talasemi Minör	↑ Hb A ₂ , hafif ↑ Hb F
β^0 -Talasemi	β^0/β	Talasemi Minör	↑ Hb A ₂ , hafif ↑ Hb F
$\delta\beta^0$ -Talasemi	$\delta\beta^0/\delta\beta$	Talasemi Minör	%5-20 Hb F
Hb Lepore	Hb Lepore/ β	Talasemi Minör	↑ Hb F, ↓ Hb A ₂ %5-15 Hb Lepore

Homozigot Beta Talasemi (Talasemi Majör)

- Sarılık, splenomegali, mongoloid görüntü
- Hipokrom mikrositer hemolitik anemi, ileri poikilositoz, target hücreler, Howell Jolly Cisimleri, siderositler ve şiddetli normoblastozis görülür.
- β^0 Talasemilerde HbA yoktur ve HbF %98'e kadar bulunabilir. HbA₂ yaklaşık %2'dir.
- β^+ Talasemilerde HbA vardır ve HbF oranı %60 – 95 arasındadır.
- Çoğunlukla 3.dekadın sonlarına doğru (sık transfüzyona bağlı) miyokardial siderozisin yol açtığı kalp yetmezliği sonucu kaybedilirler.

Heterozigot Beta Talasemi (Talasemi Minör)

- Tamamen normal klinik bulgular olabileceği gibi hafif-orta düzeyde anemi görülebilir.
- RBC yüksek, Hgb ve Hct düşük, MCH <22 pg, MCV 50-70 fl arasındadır.
- Orta derecede mikrositoz, poikilositoz, Target hücreler, normal ya da yüksek serum demiri görülür.
- Hemoglobin A₂ yüksektir. Yarısında HbF hafifçe yükselmiştir. Eğer HbF %5'den yüksek ise Herediter Hemoglobin F Persistansı (HPHF) geni de mevcut olabilir.



Düzen Laboratuvarlar Grubu

"Uluslararası Kalite Güvencesi"

PATIENT REPORT

V2_BThal

www.duzen.com.tr

Patient Data

Sample ID: 4512678
Patient ID: 4512678
Name:
Physician: 3402
Sex:
DOB:
Comments:

Analysis Data

Analysis Performed: 09/08/2005 15:07:07
Injection Number: 3744R
Run Number: 314
Rack ID: 0001
Tube Number: 6
Report Generated: 09/08/2005 15:53:34
Operator ID:

Peak Name	Calibrated Area %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
F	1.1	---	1.07	12742
Unknown	---	0.8	1.19	10230
P2	---	4.4	1.27	60325
P3	---	3.1	1.64	42497
Ao	---	80.0	2.45	1085045
A2	12.2*	---	3.39	145761

Total Area: 1356600

F Concentration = 1.1 %

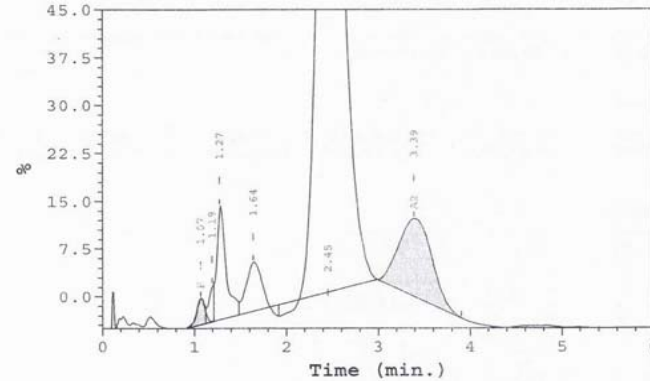
A2 Concentration = 12.2* %

*Values outside of expected ranges

Analysis comments:

HPLC ile BETA-TALASEMİ Taraması REFERANS DEĞERLER:

	HbA2	HbF	HbS	HbA (P2+P3+A0)
1 gün - 1 hafta	< 4.0	69 - 85	< 1.5	15.0 - 30.0
1 hafta - 1 ay	< 4.0	60 - 82	< 1.5	20.0 - 40.0
1 ay - 6 ay	< 4.0	10 - 70	< 1.5	25.0 - 95.0
6 ay - 1 yaş	< 4.0	0.5 - 7.0	< 1.5	87.0 - 98.0
1 yaş - 3 yaş	< 4.0	< 2.0	< 1.5	94.0 - 98.0
> 3 yaş	< 4.0	< 2.0	< 1.5	94.0 - 99.0



(*) Test ile ilgili açıklama arka sayfadadır.

ANKARA

Tunus Cad. No: 95
06680 Kavaklıdere
Tel : (312) 468 70 10
Faks : (312) 427 81 74

Atatürk Bulvarı, No: 237
06680 Kavaklıdere
Tel : (312) 468 95 41
Faks : (312) 426 99 56

Mithatpaşa Cad. No: 16
06420 Yenışehir
Tel : (312) 433 29 24
Faks : (312) 434 09 70

İSTANBUL

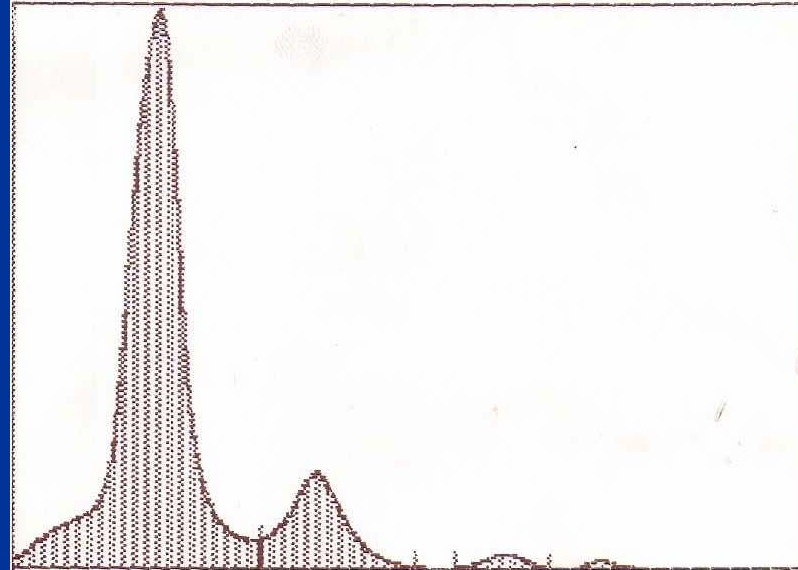
Cemal Sahir Sok. No:8
34383 Mecidiyeköy
Tel : (212) 272 48 00
Faks : (212) 272 48 04

ADANA

Atatürk Bulvarı, No: 34/2
01120 Yenışehir
Tel : (322) 454 49 01
Faks : (322) 457 55 05

DUZEN LABORATUVARLAR GRUBU
ANKARA

Patient:
Test: Hb A2 C - 9 00.09.2000
NR:



Fraction	Retn
P	23.4
W	24.4
U	2.0

Comments:





Düzen Laboratuvarlar Grubu

"Uluslararası Kalite Güvencesi"

PATIENT REPORT

V2_BTha

www.duzen.com.tr

Patient Data

Sample ID: 200060003830
Patient ID: 4441004
Name:
Physician: 20006
Sex:
DOB:
Comments:

Analysis Data

Analysis Performed: 07/02/2005 13:25:10
Injection Number: 798R
Run Number: 79
Rack ID: 0006
Tube Number: 10
Report Generated: 07/05/2005 11:38:56
Operator ID:

Peak Name	Calibrated Area %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
F	0.5	---	1.06	7196
Unknown	---	0.7	1.20	12143
P2	---	2.7	1.28	48118
P3	---	2.4	1.65	41830
A0	---	52.7	2.48	930267
A2	2.1	---	3.56	30251
D-window	---	0.6	3.91	10471
C-window	---	38.8	4.93	683809

Total Area: 1764085

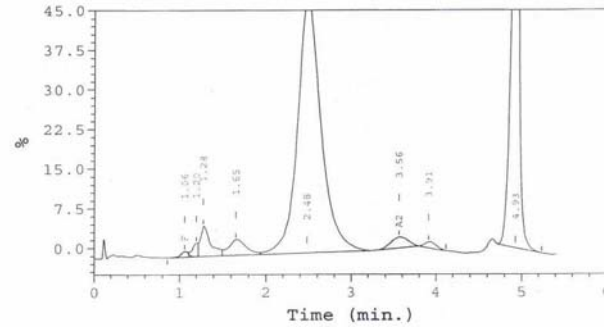
HPLC ile BETA-TALASEMI Taraması REFERANS DEĞERLER:

	HbA2	HbF	HbS	HbA (P2+P3+A0)
1 gün - 1 hafta	< 4.0	69 - 85	< 1.5	15.0 - 30.0
1 hafta - 1 ay	< 4.0	60 - 82	< 1.5	20.0 - 40.0
1 ay - 6 ay	< 4.0	10 - 70	< 1.5	25.0 - 95.0
6 ay - 1 yaş	< 4.0	0.5 - 7.0	< 1.5	87.0 - 98.0
1 yaş - 3 yaş	< 4.0	< 2.0	< 1.5	94.0 - 98.0
> 3 yaş	< 4.0	< 2.0	< 1.5	94.0 - 99.0

F Concentration = 0.5 %

A2 Concentration = 2.1 %

Analysis comments:



(*) Test ile ilgili açıklama arka sayfadadır.

ANKARA

Tunus Cad. No: 95
06680 Kavaklıdere
Tel : (312) 468 70 10
Faks : (312) 427 81 74

Atatürk Bulvarı. No: 237
06680 Kavaklıdere
Tel : (312) 468 95 41
Faks : (312) 426 99 56

Mithatpaşa Cad. No: 16
06420 Yenisehir
Tel : (312) 433 29 24
Faks : (312) 434 09 70

İSTANBUL

Cemal Sahir Sok. No:8
80300 Mecidiyeköy
Tel : (212) 272 4800
Faks : (212) 2724805

ADANA

Atatürk Bulvarı. No: 34/2
01120 Yenisehir
Tel : (322) 454 4901
Faks : (322) 457 5505

Asit agaroz jel Hb elektroforezi

+

on²² Acid Hb (



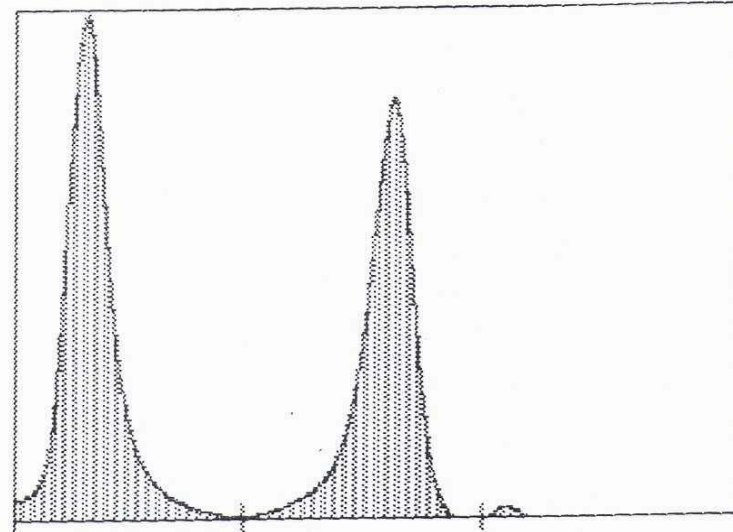
7

8

9

DUZEN LABORATUVARLARA GRUBU
ANKARA

Patient:
Test: Hb Gel 1 - 8 05.07.2005
RM: ALKALI AGAROZ JEL



Fraction	Ratio
1 Hb A	53.8
2 Hb A ₂ , G, E, O	46.2

Comments:



8