

Profile Screening dan Diagnosis Thalassemia

Thalassemia & Hemoglobinopati

Hemoglobinopati adalah

- sekelompok kondisi genetik
- diturunkan secara resesif
- berefek pada komponen hemoglobin dalam darah.

→ disebabkan oleh mutasi genetik pada gen yang mengkode rantai globin

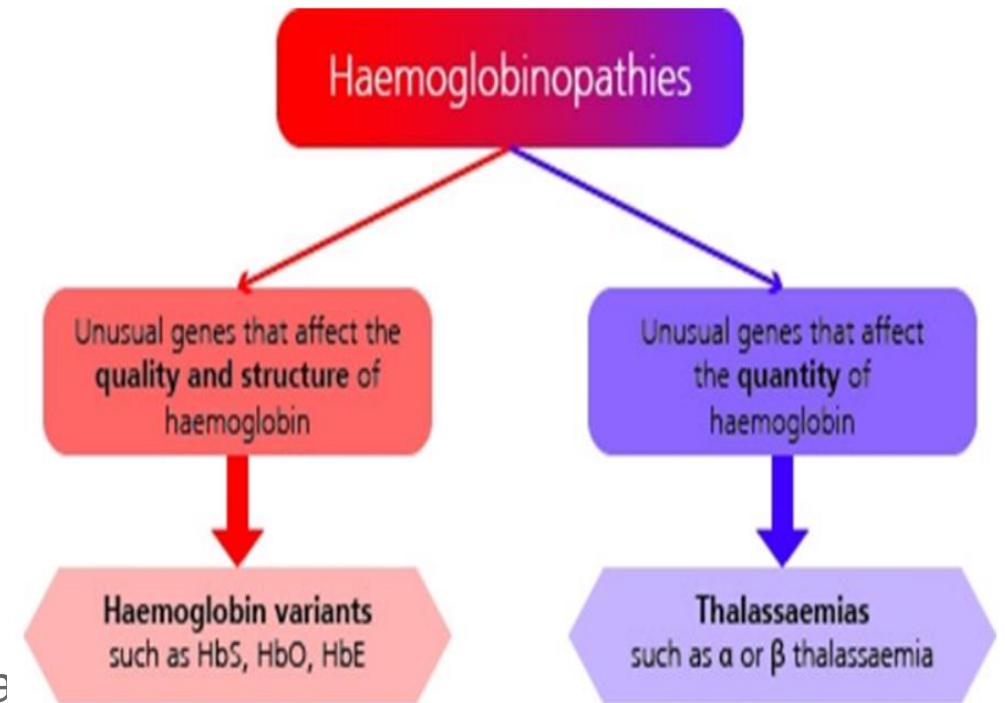
→ Terdapat lebih dari 1,000 mutasi yang telah teridentifikasi yang menyebabkan hemoglobin variant atau thalassemia.

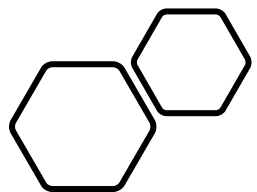
→ Sebagian besar tidak bermakna secara klinis, namun pada kondisi tertentu misalnya kombinasi dengan varian lain atau pada thalassemia, dapat menyebabkan penyakit berat atau kematian

Thalassemia & Hemoglobinopati

Hemoglobinopati:

- **Kelainan struktur** (→ hemoglobin varian, mis. HbC, Hb D, Hb E, Hb Lepore) atau **kelainan kuantitas** (→ thalassemia)
- **TIDAK** terkait gender (*x-linked*)
- Prevalensinya berbeda-beda di berbagai tempat di dunia:
 - Sickle cell disease banyak di Afrika Barat dan India
 - Thalassemia banyak di Asia and Mediterranea
- Jenis mutasi bervariasi antara kelompok etnik
- Mutasi genetik diturunkan → risiko tergantung pada riwayat keluarga
- Kemungkinan mutasi hemoglobin 'de novo' (bukan diturunkan) ada tapi jarang





Hemoglobin Normal

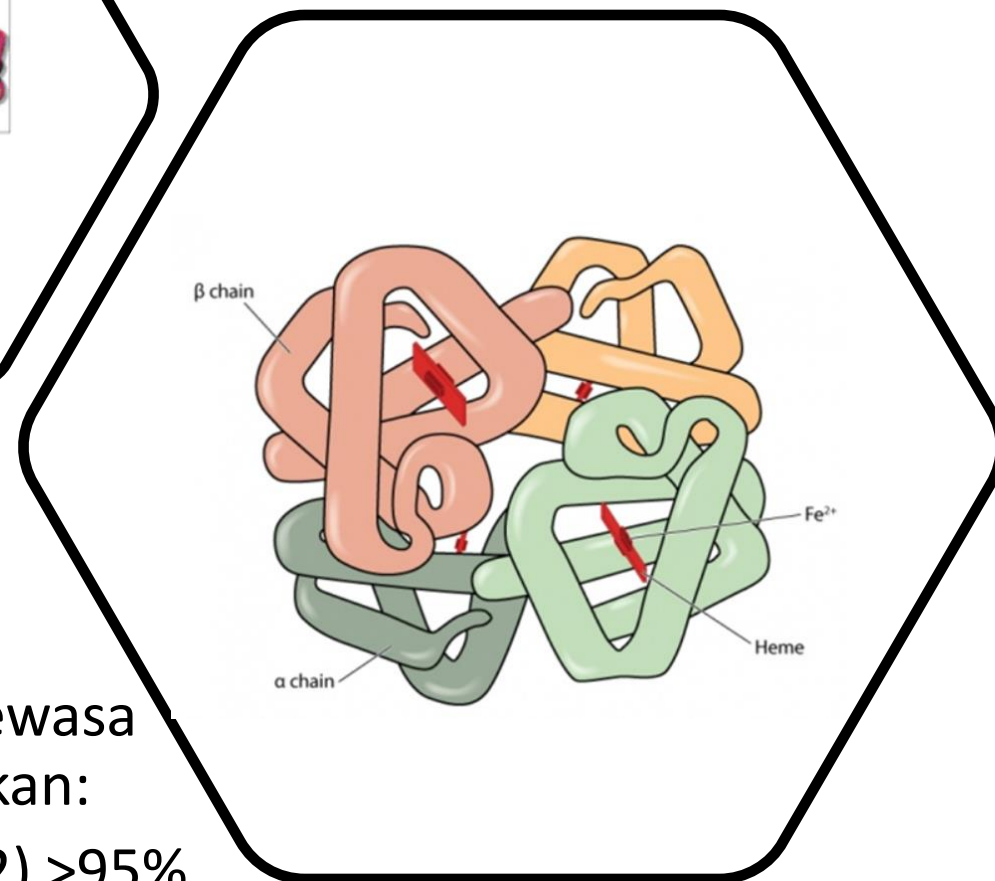
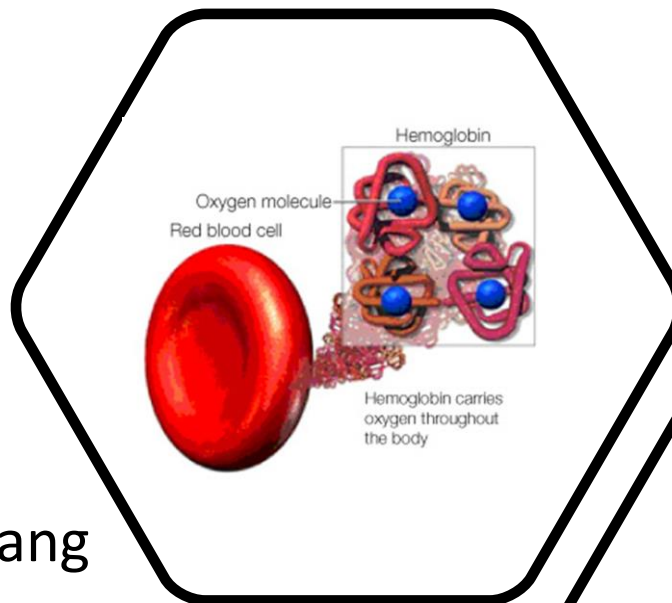
Tersusun atas 2 pasang rantai globin dengan molekul heme yang mengandung Fe.

Hemoglobin dominan pada orang dewasa normal : hemoglobin A, terdiri dari:

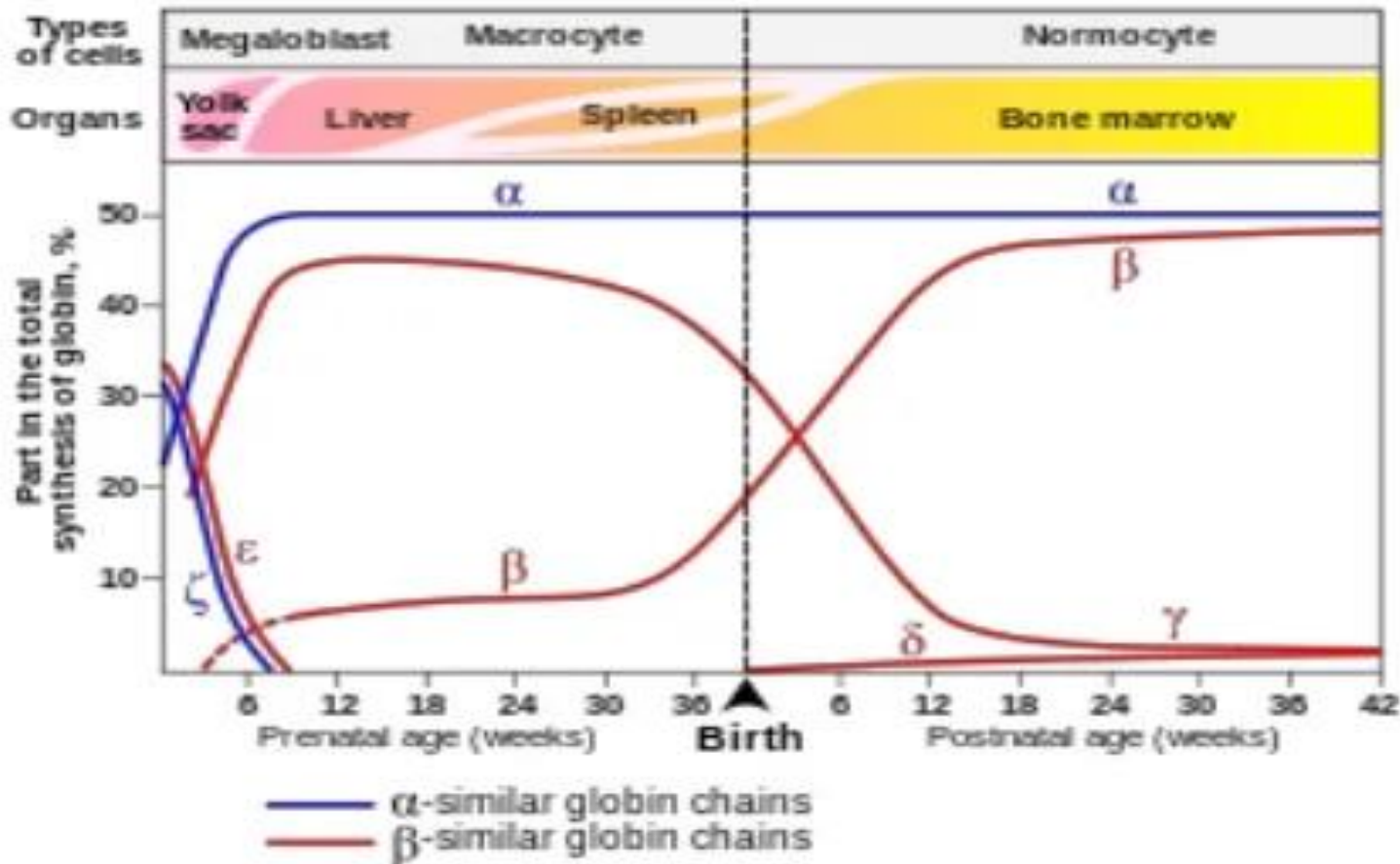
- 2 rantai globin alfa (α)
- 2 rantai globin beta (β)

Dalam darah orang dewasa normal dapat ditemukan:

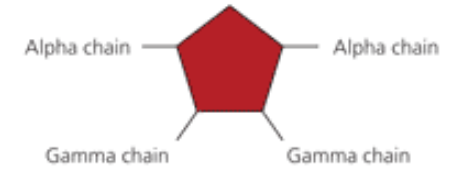
- hemoglobin A ($\alpha_2\beta_2$) >95%
- hemoglobin A₂ ($\alpha_2\delta_2$) 2% -3.4%
- hemoglobin F (fetal) ($\alpha_2\gamma_2$) <1%



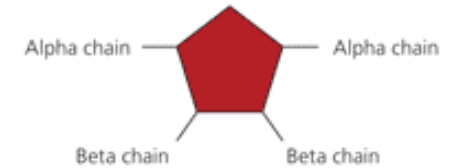
Perubahan komposisi Hb



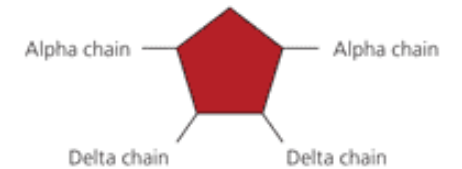
Hemoglobin F ($\alpha_2\gamma_2$)



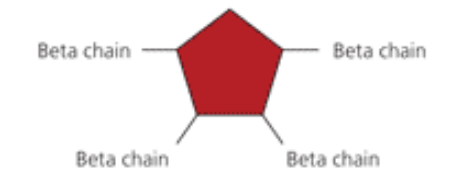
Hemoglobin A ($\alpha_2\beta_2$)



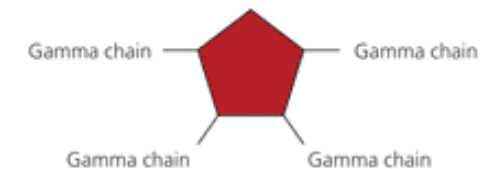
Hemoglobin A2 ($\alpha_2\delta_2$)



Hemoglobin H (β_4)



Hemoglobin Bart's (γ_4)



Jenis-jenis Thalassemia

- Berdasarkan beratnya kondisi klinis:
 - Thalassemia minor/ trait: anemia ringan atau tanpa anemia
 - Thalassemia intermedia : anemia sedang, tidak memerlukan transfusi reguler
 - Thalassemia mayor : anemia berat, perlu transfusi reguler (transfusion-dependent)
- Berdasarkan rantai globin yang terdampak:
 - Thalassemia alfa : defek/ delesi pada gen yang menyebabkan penurunan produksi rantai globin alfa
 - Thalassemia beta : defek/ delesi pada gen yang menyebabkan penurunan produksi rantai globin beta

Gejala klinis

Thalassemia intermedia :

- Gejala anemia ringan atau sedang
- Gangguan pertumbuhan
- Pubertas terlambat
- Kelainan tulang, misal osteoporosis
- Pembesaran limpa

Thalassemia mayor :

- Gejala anemia berat
- Tidak nafsu makan
- Kulit pucat dan kuning
- Urin berwarna seperti teh
- Struktur tulang wajah abnormal

Bone deformities



thalassemic facies (maxilla hyperplasia, flat nasal bridge, frontal bossing)



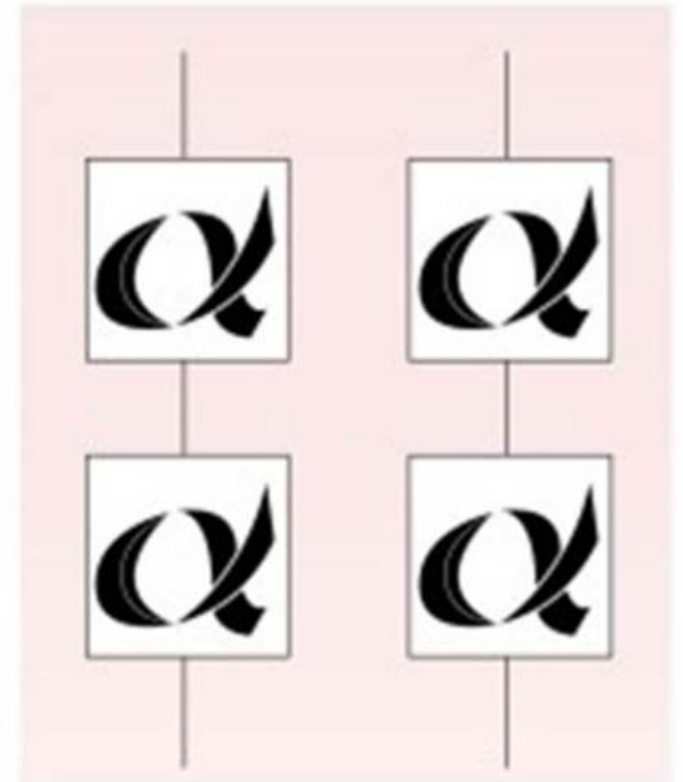
Hair on End Appearance

Pengobatan thalassemia mayor meliputi terapi transfusi jangka Panjang, khelasi besi, splenektomi, transplantasi sel punca alogenik, terapi gen dan terapi suportif lain.

Thalassemia alfa

- Gen globin alfa terletak di kromosom 16 dan terdiri dari 4 gen, masing-masing 2 dari tiap orang tua
- Pembawa sifat thalassemia alfa harus dikonfirmasi dengan pemeriksaan Analisa DNA thalassemia alfa.

Normal alpha chain profile

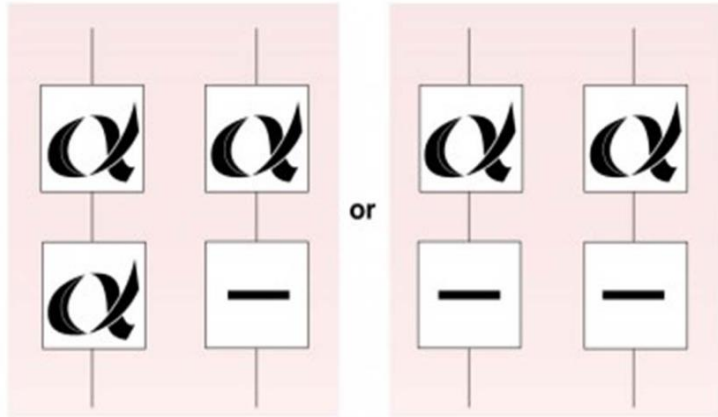


Thalassemia alfa

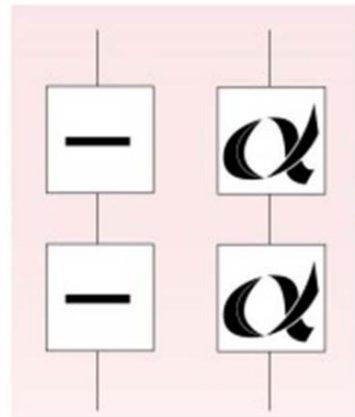
<i>Varian</i>	<i>Kromosom 16</i>	<i>Gejala</i>
Alpha thalassemia silent carrier	1 gen delesi	Asimptomatik
Alpha thalassemia trait	2 gen delesi	Asimptomatik
Hemoglobin Constant Spring	Berkurangnya produksi rantai alfa	Tanpa gejala atau gejala ringan
Thalassemia alfa intermedia dengan peningkatan hemoglobin H yang signifikan (hemoglobin H disease)	3 gen delesi	Anemia sedang sampai berat, pembesaran limpa dan perubahan tulang
Thalassemia alfa mayor dengan peningkatan signifikan hemoglobin Bart's	4 gen delesi	Menyebabkan hydrops fetalis

Thalassemia alfa

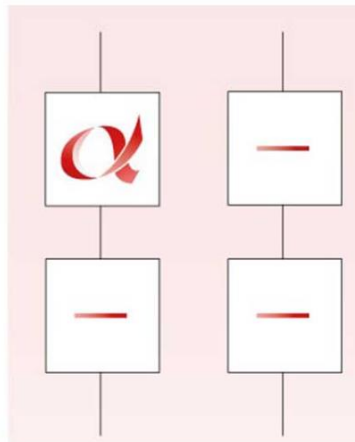
Alpha plus thalassaemia carrier



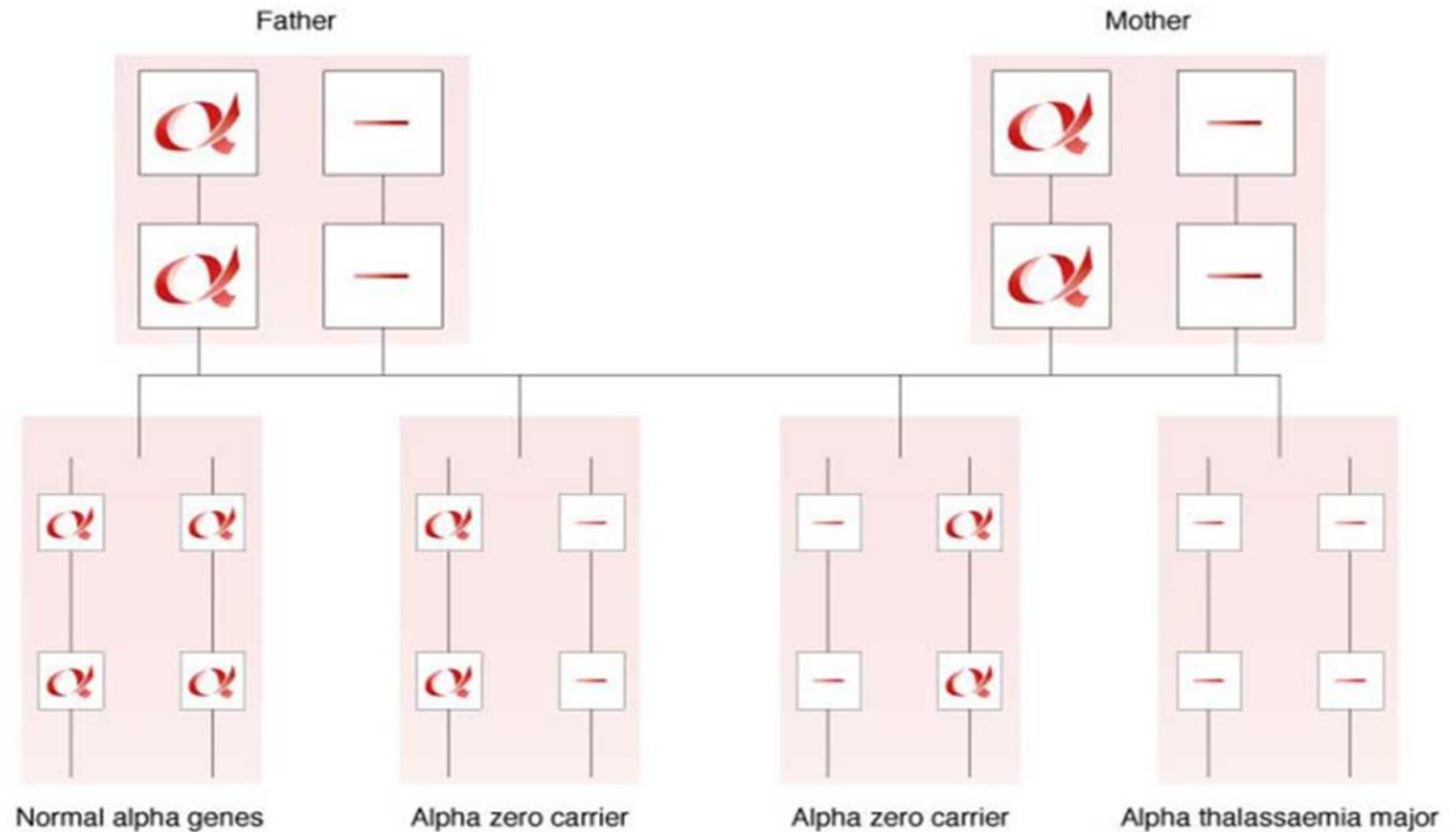
Alpha zero carrier



Haemoglobin H disease

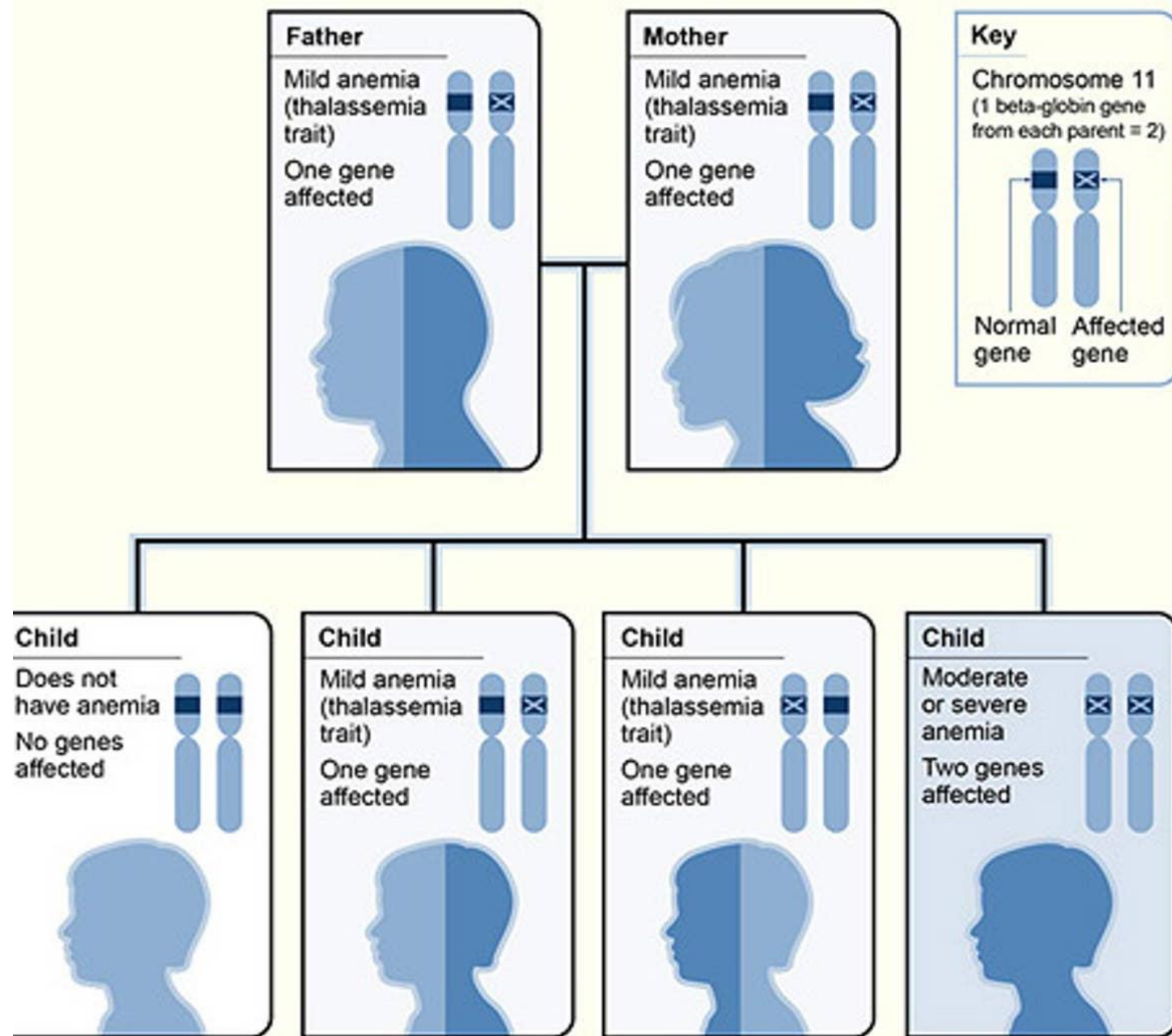


Inheritance of alpha thalassaemia major



Thalassemia beta

- Gen globin beta terletak di kromosom 11 dan terdiri dari 2 gen, masing-masing 1 dari tiap orang tua
- Dibedakan menjadi thalassemia beta trait (defek 1 gen), thalassemia beta intermedia (defek 2 gen atau Thal beta/HbE), thalassemia beta mayor (defek 2 gen, Cooley's anemia)



Pemeriksaan Laboratorium untuk Thalassemia

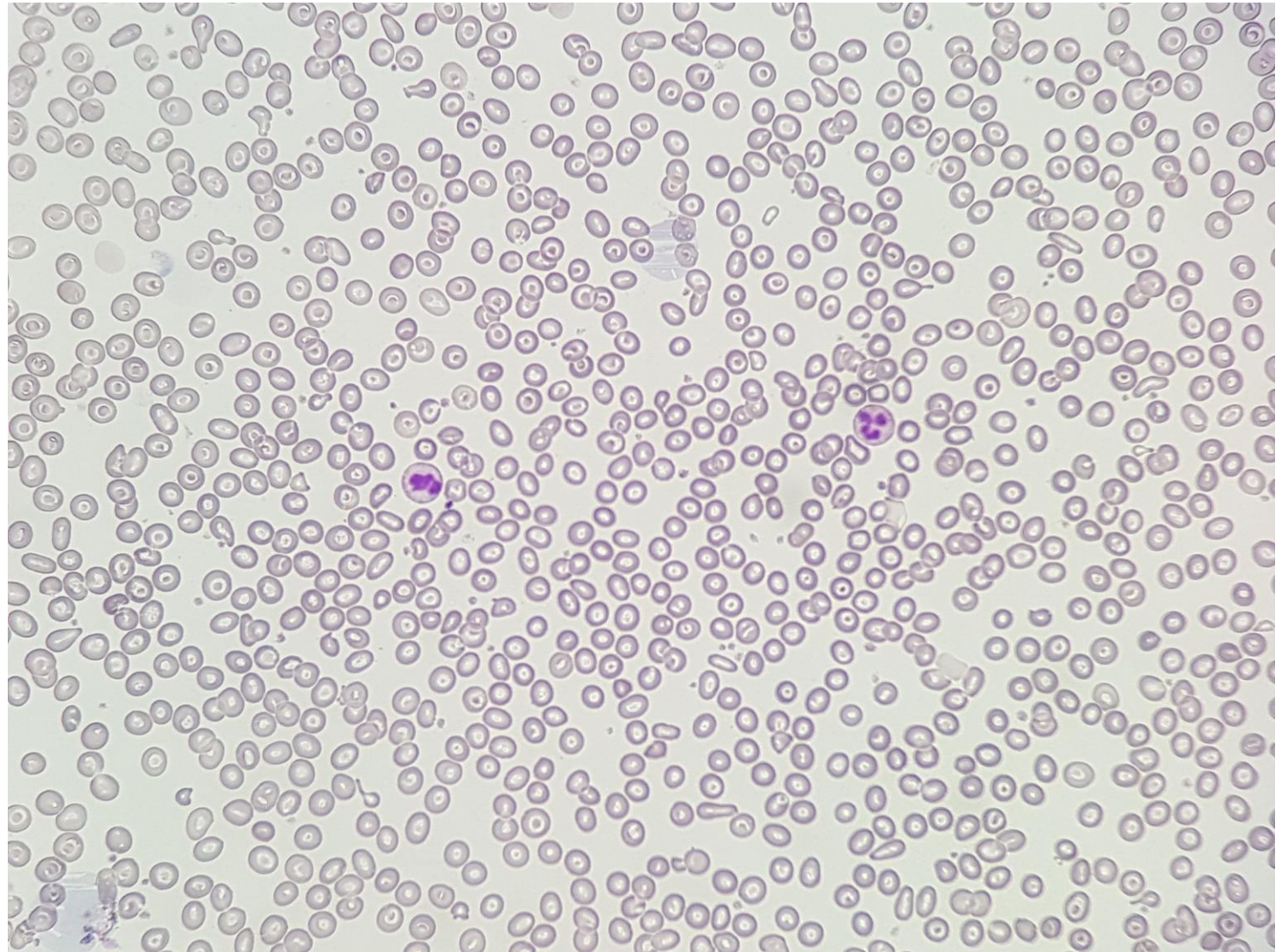
- [complete blood count \(CBC\)](#) / Hematologi dan gambaran darah tepi lengkap : anemia mikrositik
- [reticulocyte count](#) / Pewarnaan supravital : menilai produksi eritrosit dan adanya HbH *inclusion bodies*
- Pemeriksaan status besi (SI, TIBC, feritin) : untuk menyingkirkan defisiensi Fe
- [Hemoglobin electrophoresis](#) : untuk mendiagnosis thalassemia beta
- Pemeriksaan genetic : untuk mendiagnosis thalassemia alfa.

Pemeriksaan Laboratorium Thalassemia

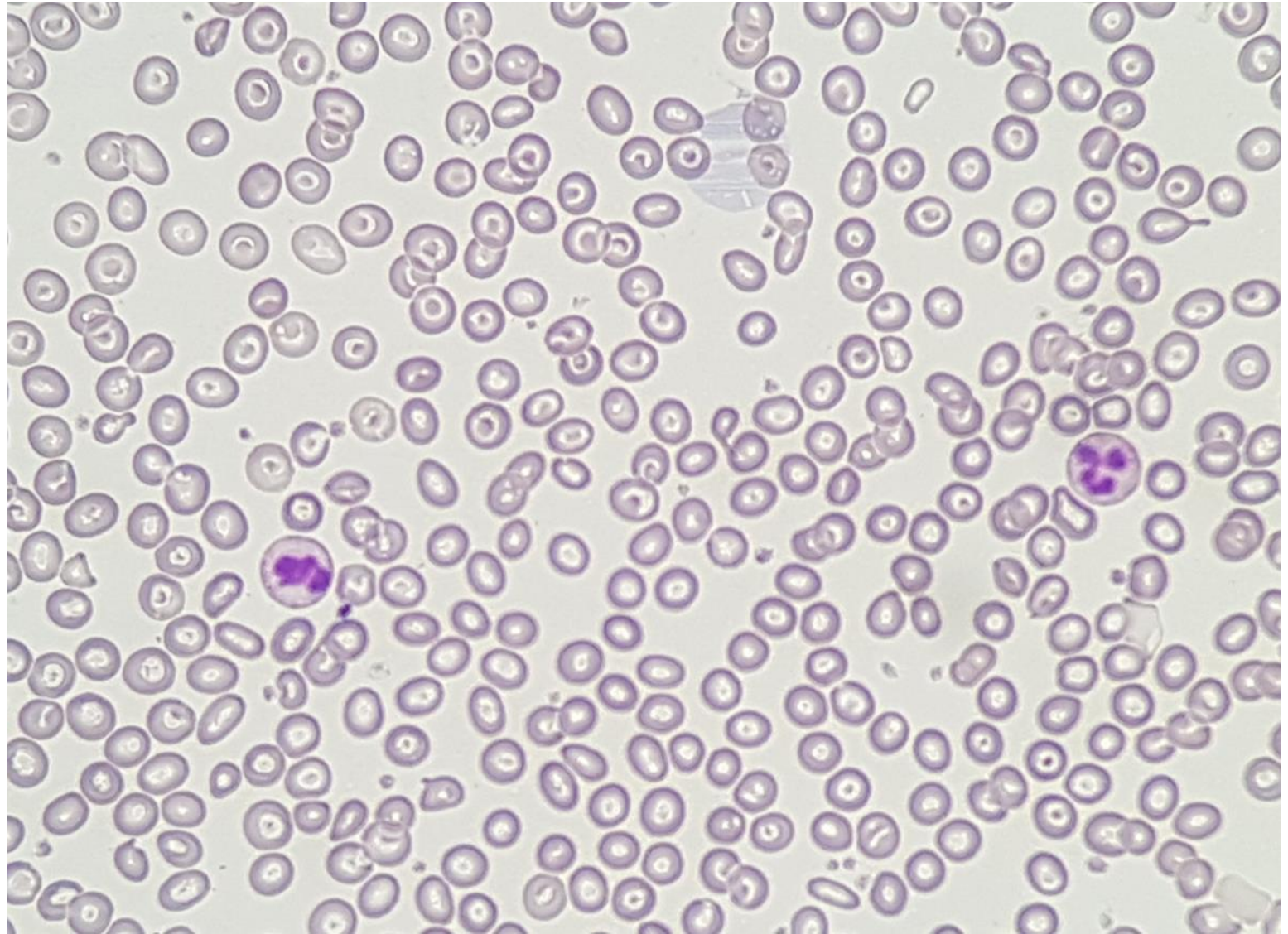
<i>Pemeriksaan</i>	<i>Iron deficiency</i>	<i>Beta thalassemia</i>	<i>Alpha thalassemia</i>
MCV abnormal: < 80 fl (dewasa) < 70 fl (anak usia 6 bln-6thn) < 76 fl (anak usia 7-12 tahun)	Rendah	Rendah	Rendah
RDW	Tinggi	Normal; kadang tinggi	Normal
Ferritin	Rendah	Normal	Normal
Mentzer index untuk anak (MCV/hitung eri)	> 13	< 13	< 13
Hb electrophoresis	Normal (HbA2 mungkin rendah)	HbA2 meningkat HbA menurun HbF meningkat/ normal	Dewasa: normal Neonatus: HbH atau Hb Bart's mungkin (+)

Hematologi Lengkap + GDT

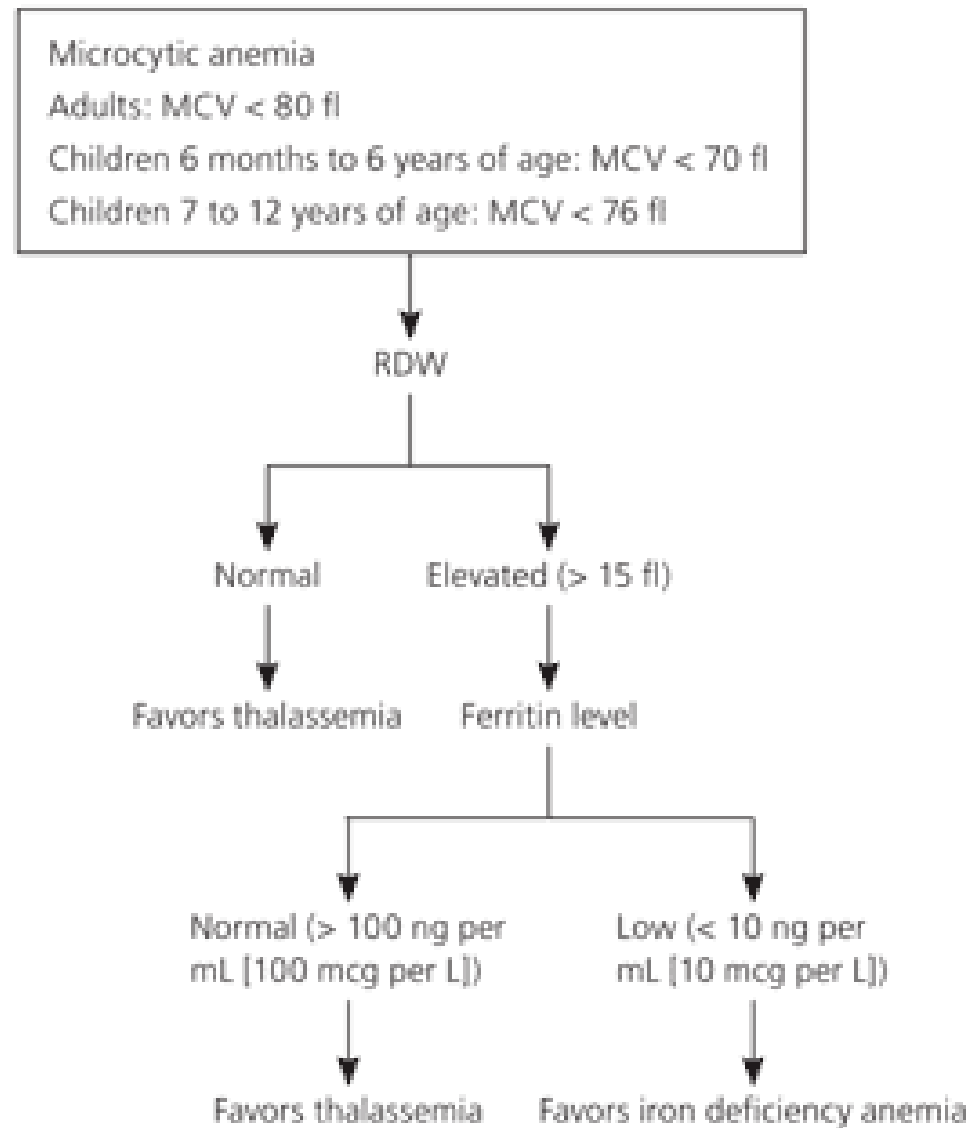
Positive			
Diff. Morph.			
WBC	3.09	[$10^3/uL$]	
RBC	6.12 +	[$10^6/uL$]	
HGB	11.1	[g/dL]	
HCT	35.4	[%]	
MCV	57.8 -	[fL]	
MCH	18.1 -	[pg]	
MCHC	31.4	[g/dL]	
PLT &F	176	[$10^3/uL$]	
RDW-SD	31.0 -	[fL]	
RDW-CV	16.3 +	[%]	
PDW	----	[fL]	
MPV	----	[fL]	
P-LCR	----	[%]	
PCT	----	[%]	
NRBC	0.01	[$10^3/uL$]	0.3
NEUT	0.72 *	[$10^3/uL$]	23.3 *
LYMPH	1.95 *	[$10^3/uL$]	63.1 *
MONO	0.34 *	[$10^3/uL$]	11.0 *
EO	0.07	[$10^3/uL$]	2.3
BASO	0.01	[$10^3/uL$]	0.3
IG	0.01 *	[$10^3/uL$]	0.3 *
RET	0.35	[%]	0.0214
IRF	2.0	[%]	
LFR	98.0	[%]	
MFR	2.0	[%]	
HFR	0.0	[%]	
RET-He	18.0	[pg]	
IPF	5.2	[%]	
WBC-BF		[$10^3/uL$]	
RBC-BF		[$10^6/uL$]	
MN		[$10^3/uL$]	
PMN		[$10^3/uL$]	
TC-BF#		[$10^3/uL$]	
WBC IP Message			
Neutropenia			
Atypical Lympho?			
RBC IP Message			
Microcyte			
Fragments			



Gambaran
darah tepi

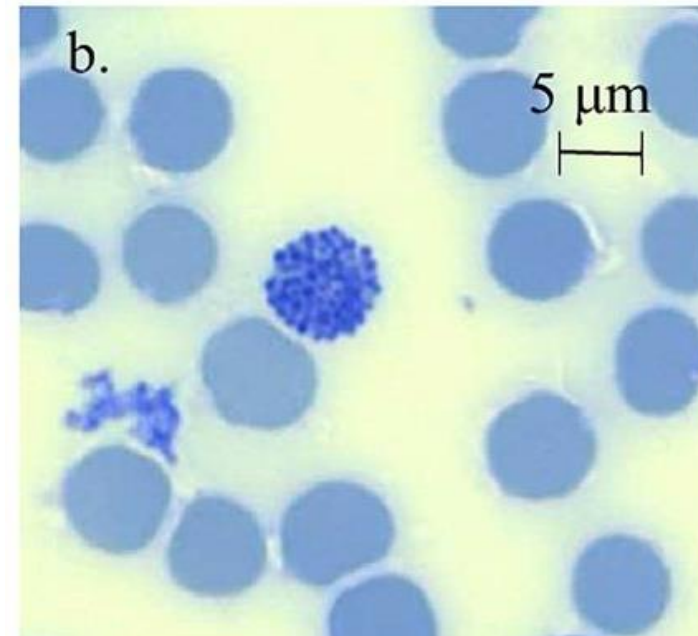
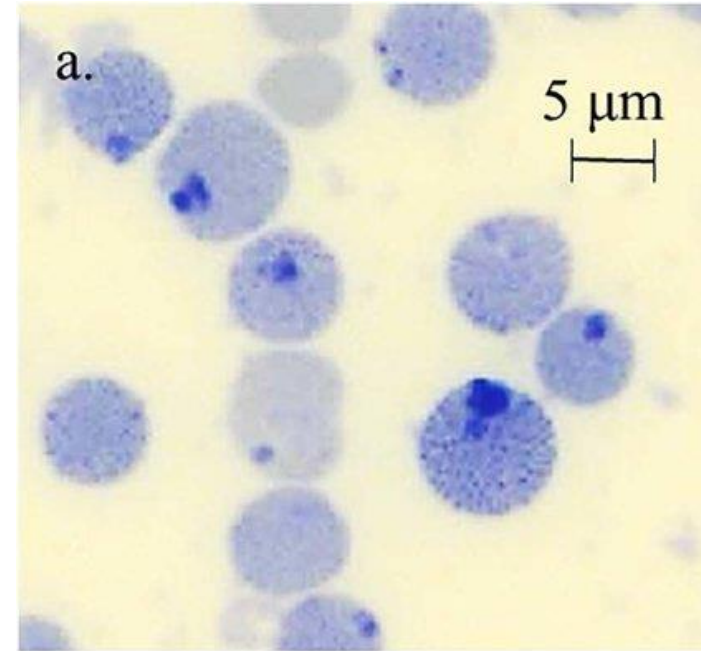


MCV, RDW
dan dan
ferritin




HbH Inclusion Bodies

- Menggunakan pewarnaan supravital: New Methylene Blue atau Brilliant Cresyl Blue
- Presipitasi HbH yang teroksidasi → Golf-ball like appearance
- Pada thalassemia alfa trait : 1/1000-10000
- Pada HbH disease : 30-100%



Analisis hemoglobin

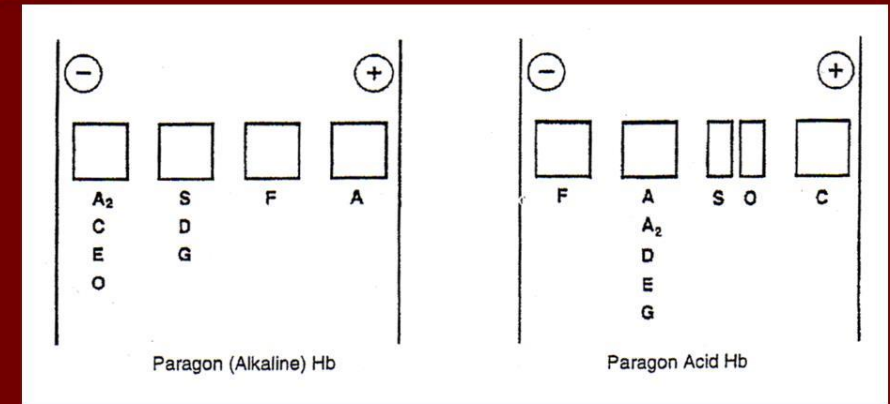
Beberapa metode untuk analisis hemoglobin:

- Elektroforesis gel
 - Isoelectric focusing
 - Capillary electrophoresis
 - High-performance liquid chromatography
- 
- sensitive dan teliti

Elektroforesis gel

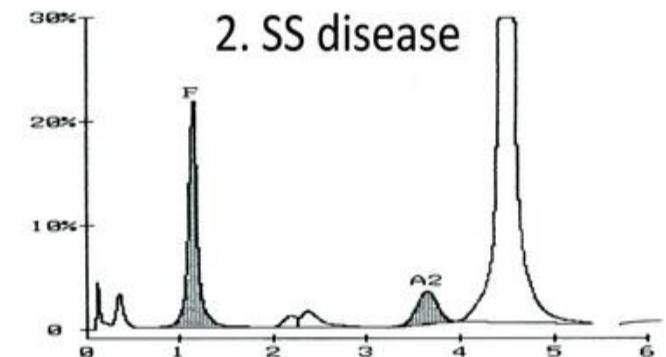
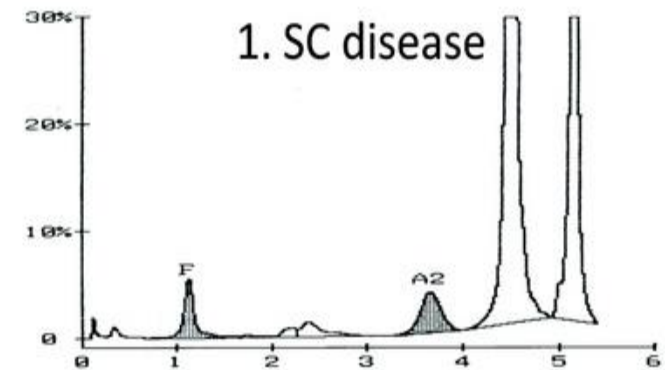
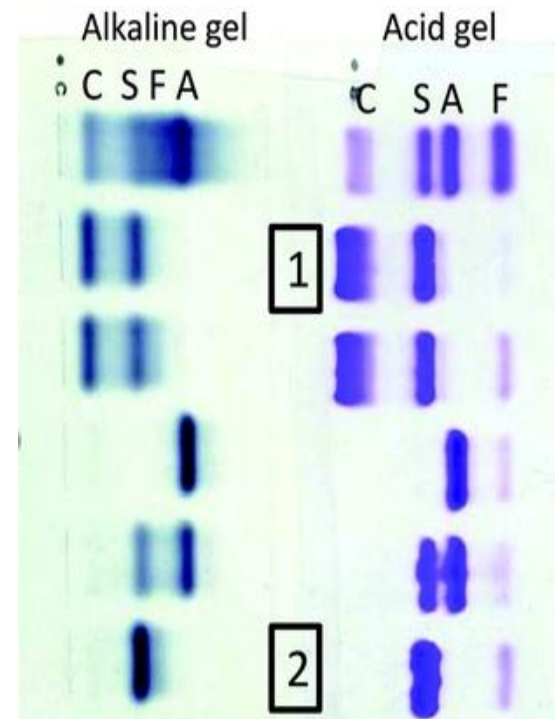
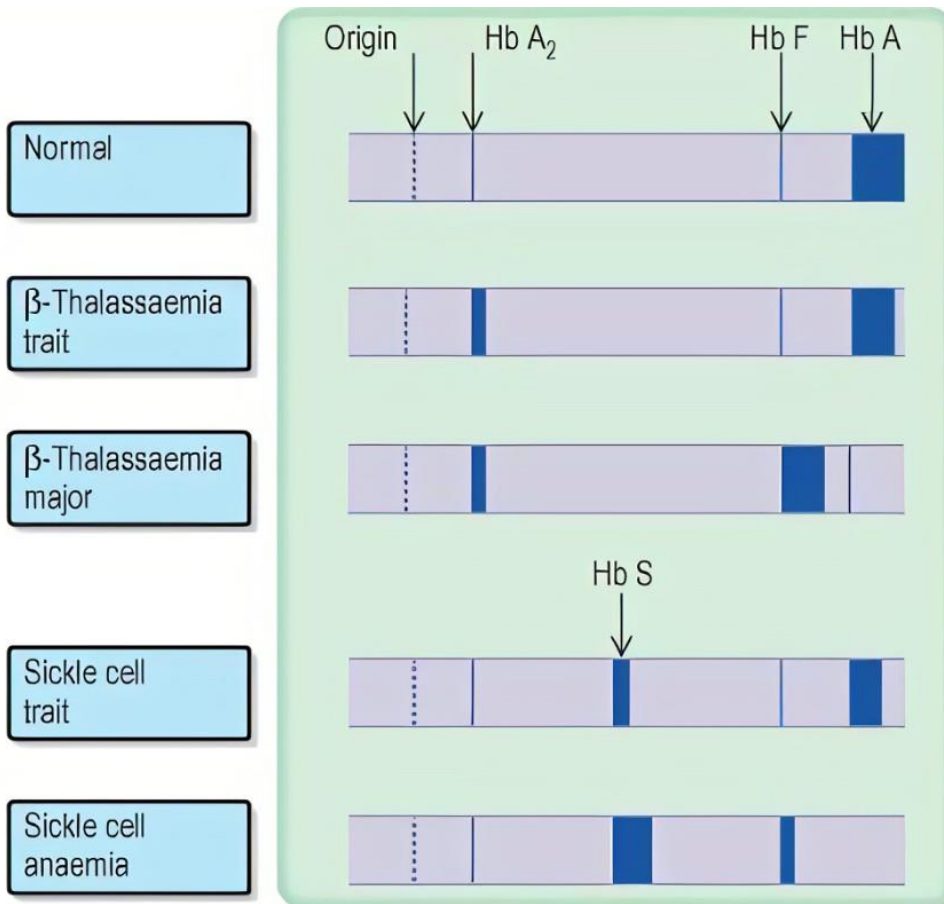
- Secara tradisional merupakan metode pilihan untuk identifikasi dan kuantifikasi Hb varian
- Berdasarkan separasi fraksi Hb pada pH 8.4 (alkali) dan pH 6.2 (asam) pada gel agarose
- Kuantifikasi fraksi Hb dilakukan dengan densitometric scanning setelah visualisasi pita Hb dengan Amino Black dan Acid Violet (atau pulasan serupa).
- Kelemahan: lambat, *labor-intensive*, kurang akurat dalam kuantifikasi Hb dengan konsentrasi rendah (misal Hb A₂) atau deteksi Hb variant yang bermigrasi cepat (Hb H, Hb Barts).

Hemoglobin Electrophoresis Patterns



- Pada pH alkali, migrasi elektroforesis Hb C, Hb E, Hb A₂, dan Hb O sama. Hb S, Hb D, dan Hb G juga bermigrasi bersama.
- Pada pH asam, dapat dipisahkan Hb C dari Hb E, Hb O dan Hb S dari Hb D dan Hb G.
- Tidak dapat membedakan antara Hb E dan Hb O, Hb D dan Hb G

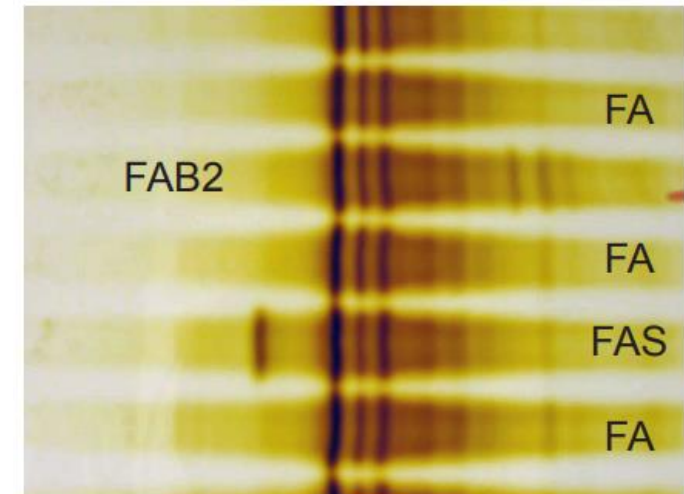
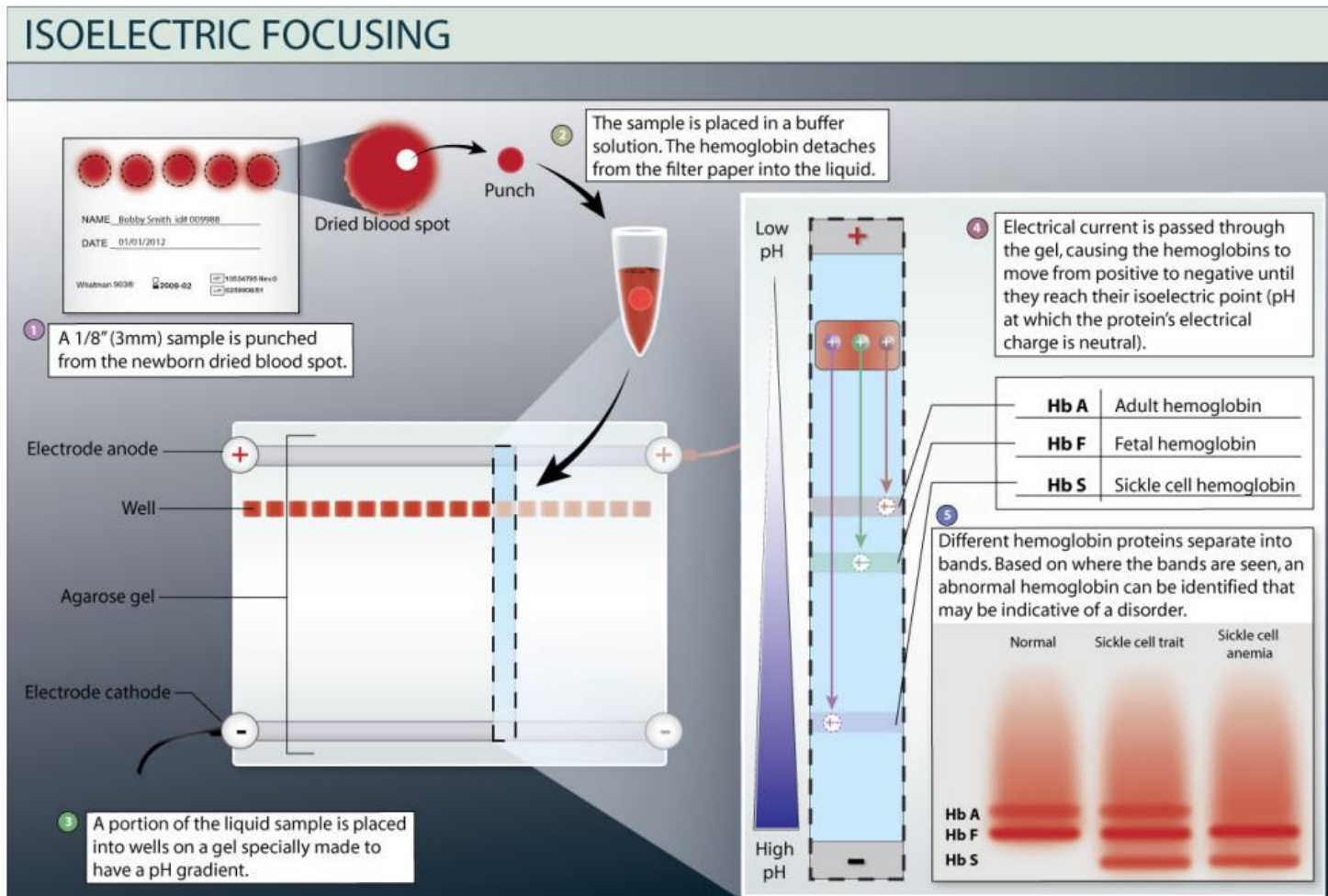
Elektroforesis gel



Isoelectric Focusing

- Teknik elfor dengan resolusi sangat baik
- *Labor-intensive*, makan waktu
- Digunakan untuk identifikasi dan kuantifikasi fraksi Hb
- Merupakan proses equilibrium dimana Hb bermigrasi dalam gradien pH ke posisi muatan net 0.
- Urutan migrasi Hb sama dengan elektroforesis pH alkali dengan pemisahan Hb C dari Hb E, Hb O dan Hb S dari Hb D dan Hb G
- Hb A dan Hb F terpisah jelas
- Band lebih sempit → kuantifikasi lebih teliti dan tepat daripada elektroforesis standar

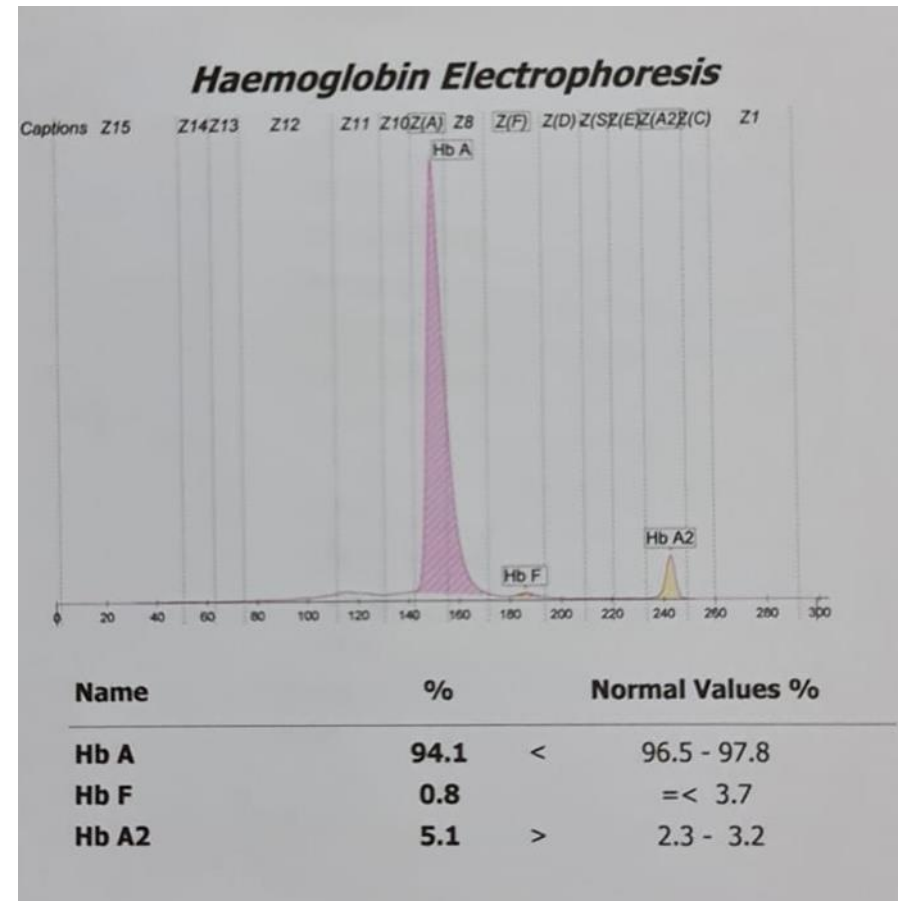
Isoelectric focusing



FA : normal
FAB2 : thalassemia alfa
FAS : Sickle cell trait

Capillary Electrophoresis

- Berdasarkan elektroforesis kapiler dalam laurtan bebas dari katode ke anode
- Fraksi Hb dipisahkan dalam kapiler silika berdasarkan aliran elektroosmotik pada voltase tinggi (9,800 V) secara elektroforesis dalam buffer alkali.
- Fotometri pada absorbance wavelength 415 nm digunakan untuk mendeteksi fraksi Hb secara langsung.
- Electrophorogram dibagi menjadi 15 zona



High-performance liquid chromatography (HPLC)

- Merupakan sistem *cation exchange*
- Menggunakan 2 pompa piston ganda untuk mengatur buffer natrium fosfat dengan kekutan ionic yang makin meningkat untuk melewati resin cation exchange selama 6.5 menit.
- Kromatogram dipisahkan berdasarkan waktu retensi (RT).

Peak Name	Calibrated Area %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
Unknown	----	0.2	0.61	7251
Unknown	----	6.6	0.90	206295
F	2.9*	----	1.05	90047
Unknown	----	1.5	1.18	48564
P2	----	2.5	1.32	79485
P3	----	0.7	1.57	21441
Unknown	----	32.8	1.94	1028475
Ao	----	49.8	2.39	1562570
A2	2.7	----	3.59	91518

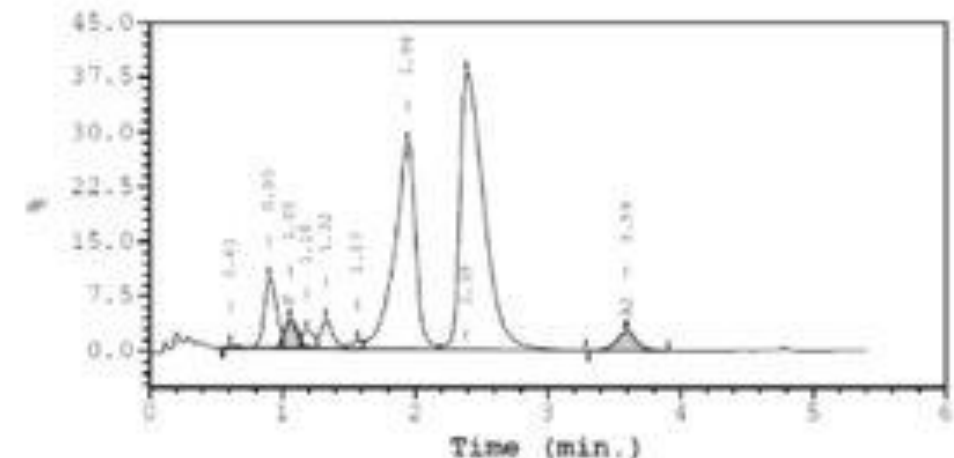
Total Area: 3,135,645*

F Concentration = 2.9* %

A2 Concentration = 2.7 %

*Values outside of expected ranges

Analysis comments:



- **dna analysis** After presumptive identification of hemoglobinopathies and thalassemia syndromes, and particularly for purposes of genetic counseling, defining the mutation or deletion present may be required. Several molecular techniques are available. DNA from white blood cells, amniocytes, or chorionic tissue may be utilized for diagnosis of various α - and β -globin chain abnormalities. Typically, deletional mutations causing α -thalassemia syndromes and some rare β -thalassemias are diagnosed using Southern blot hybridization of particular restriction enzyme digests to labeled complementary gene probes. PCR techniques using allele-specific probes after globin gene amplification, allele-specific primers, or deletion-dependent amplification with flanking primers are used in definition of known globin chain mutations/deletions, including those for Hb S, E, D, and O, and several β -thalassemias (14, 30–38). For unknown mutations, several PCR-based methods, including denaturing gradient gel electrophoresis and single-strand conformation polymorphism analysis, as well as sequencing of the amplified globin gene DNA may be used (37).

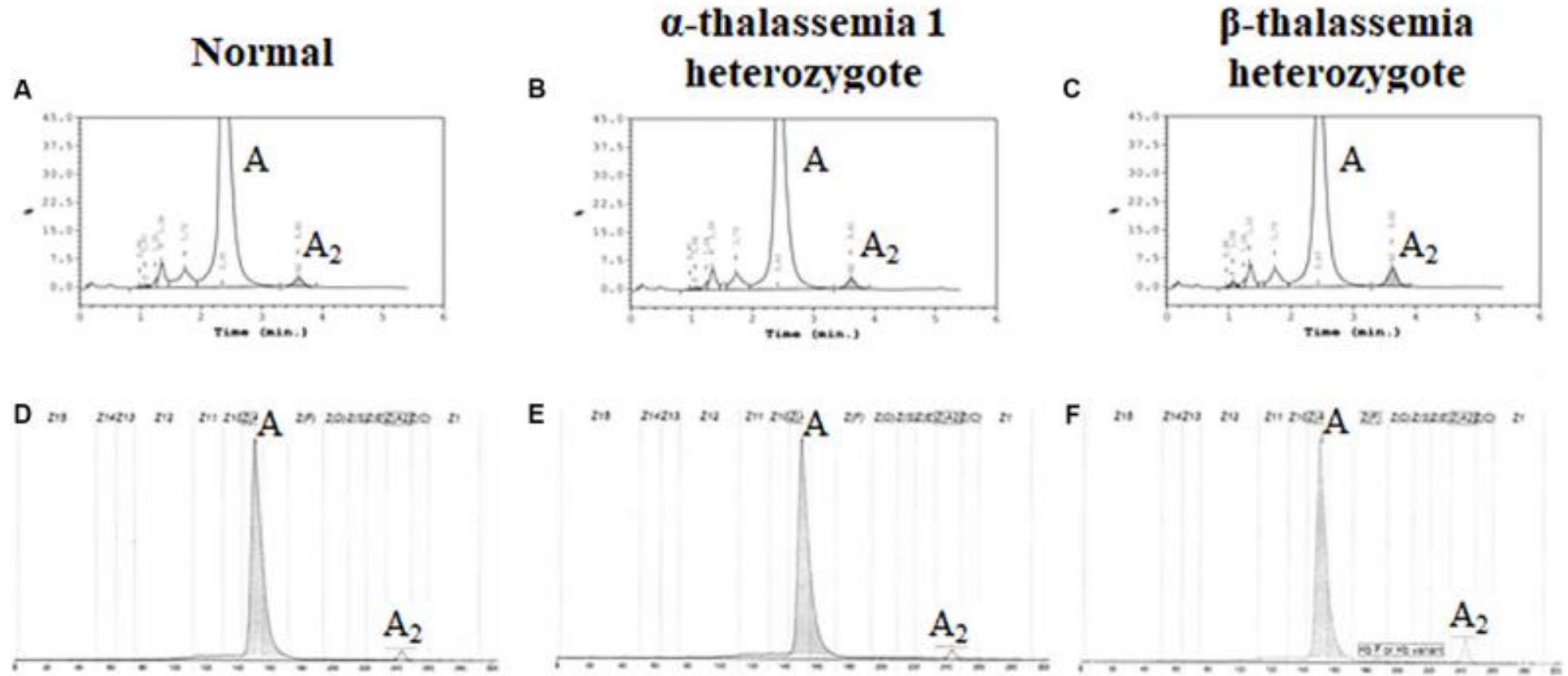
Analisa DNA thalassemia

TABLE 3 | Summary of common molecular technique used for point mutation detection.

Known mutation	Unknown mutation
Gel electrophoresis	Mismatched analysis
Allele-specific PCR	Denaturing gradient gel electrophoresis
Dot blot analysis	DNA sequencing
Real-time PCR with melting curve analysis	

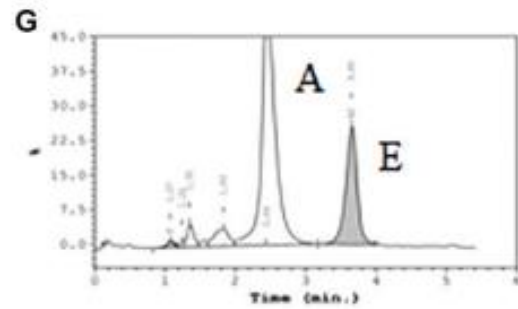
All of these techniques developed after gene amplification by polymerase chain reaction (PCR).

CE vs HPLC

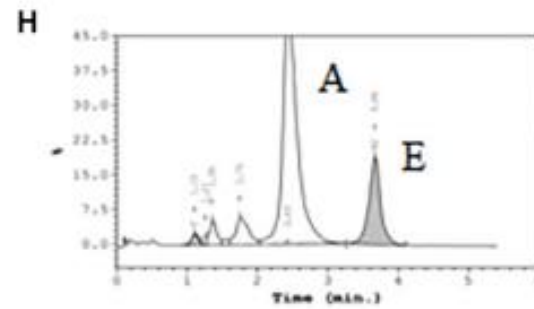


CE vs HPLC

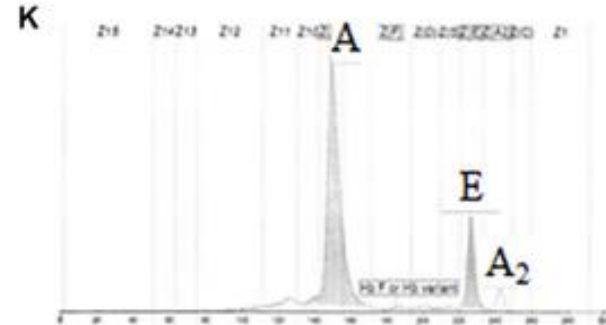
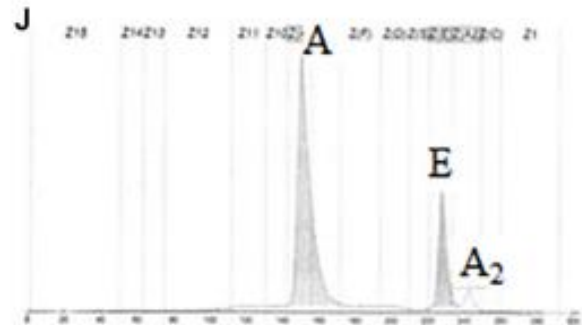
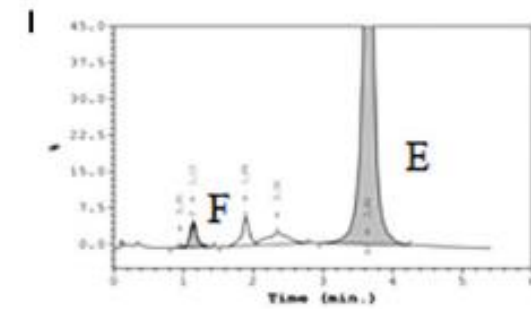
Hb E heterozygote



**Hb E heterozygote
with
 α -thalassemia 1 heterozygote**

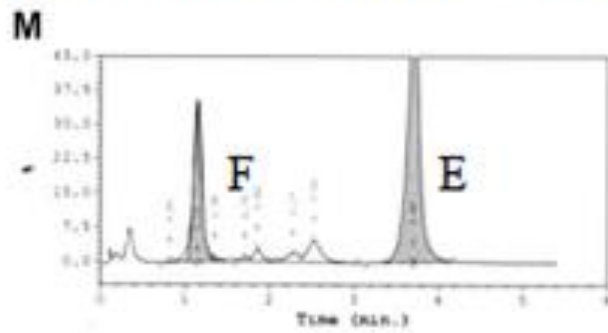


Hb E homozygote

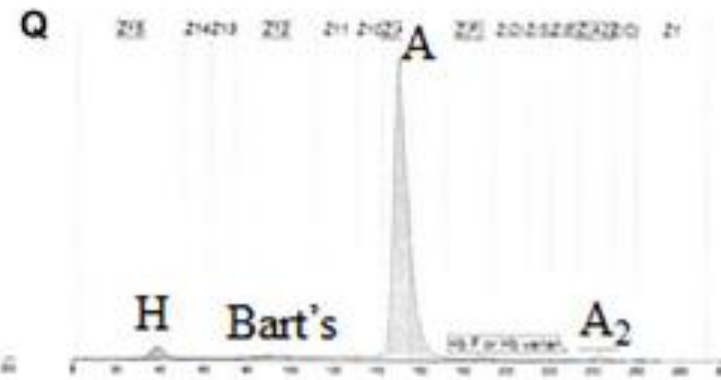
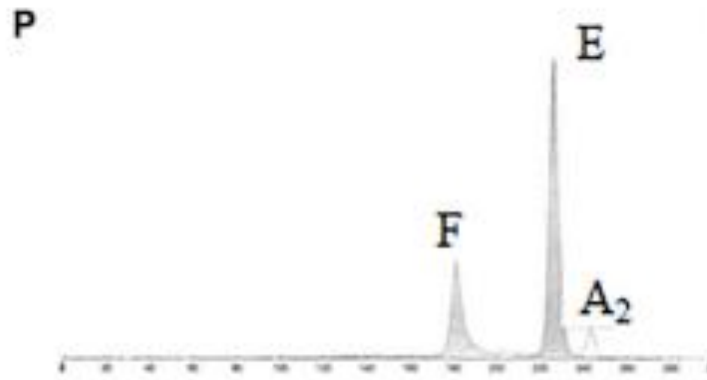
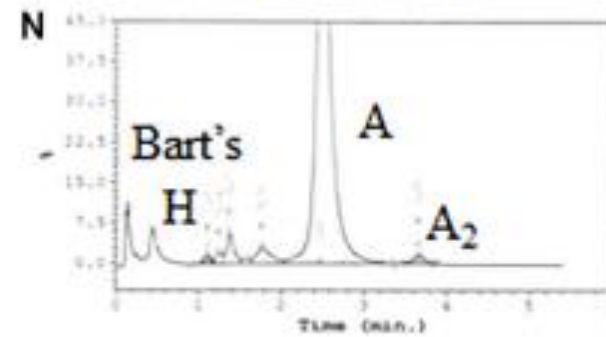


CE vs HPLC

β -thalassemia/Hb E disease



Hb H disease



Terima kasih

