

# Le dépistage de la drépanocytose

## Le point de vue du laboratoire

François Boemer – Olivier Ketelslegers

Dépistage néonatal des hémoglobinopathies, Bruxelles - 26 mai 2023

# Le point de vue du laboratoire

- Principes des techniques de dépistage de masse de la drépanocytose
- Organisation du dépistage de la drépanocytose jusqu'en 2022
- Statistiques du dépistage en Belgique jusqu'en 2022
- Le dépistage en 2023

# Dépistage de masse de la drépanocytose

**(IEF)**

**EC**

**HPLC**

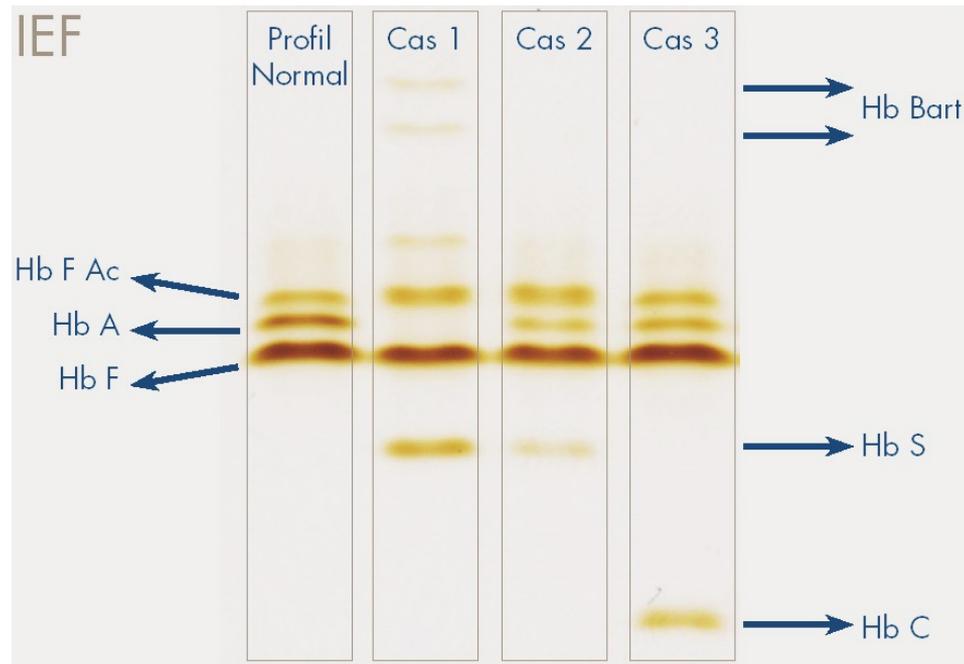
**MS/MS**

Séparation des hémoglobines sur base de leurs différences de masse et de charge électrique

# Isoélectrofocalisation sur gel (IEF)

## Hémoglobines chez le nouveau-né

- Hb F 60-90%
- Hb A 10-40%
- Hb A<sub>2</sub> peu ou pas



- Séparation des hémoglobines dans un gradient de pH en fonction de leur point isoélectrique

# Isoélectrofocalisation sur gel (IEF)

- Sensible
- Excellente résolution
- Détection de tous les variants
- Technique manuelle
- Qualitative

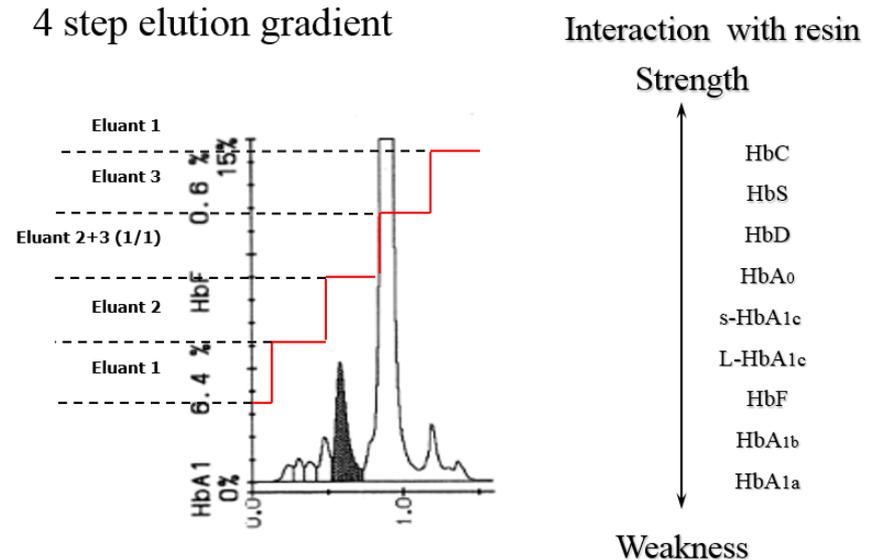
> Technique abandonnée au profit de techniques automatisées et quantitatives

# Techniques quantitatives automatisées

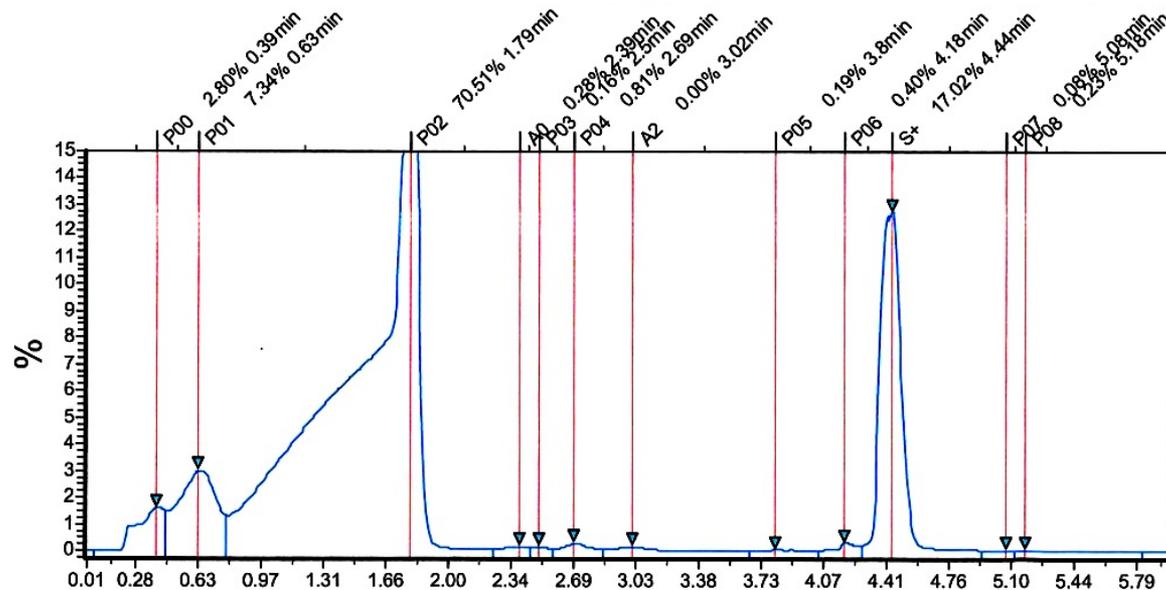
- électrophorèse capillaire (EC)
- chromatographie liquide de haute performance (HPLC)
- spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

# Chromatographie liquide de haute performance (HPLC)

- Les analytes sont dissous dans une phase liquide qui est mobilisée (sous l'effet d'une **haute pression**) dans une colonne contenant une matrice solide (=résine échangeuse d'ions)
- Séparation par élution à l'aide d'éluants successifs créant un gradient de force ionique croissante (**interaction différentielle avec la résine selon la charge et la taille**)

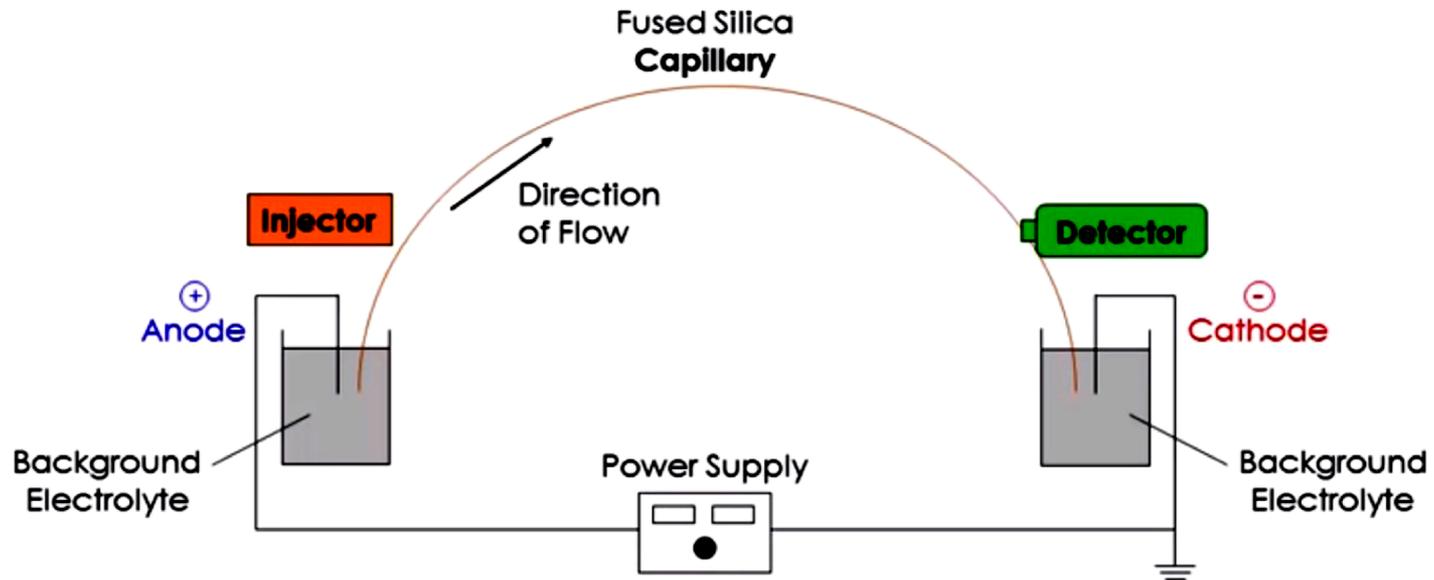


# Chromatographie liquide de haute performance (HPLC)

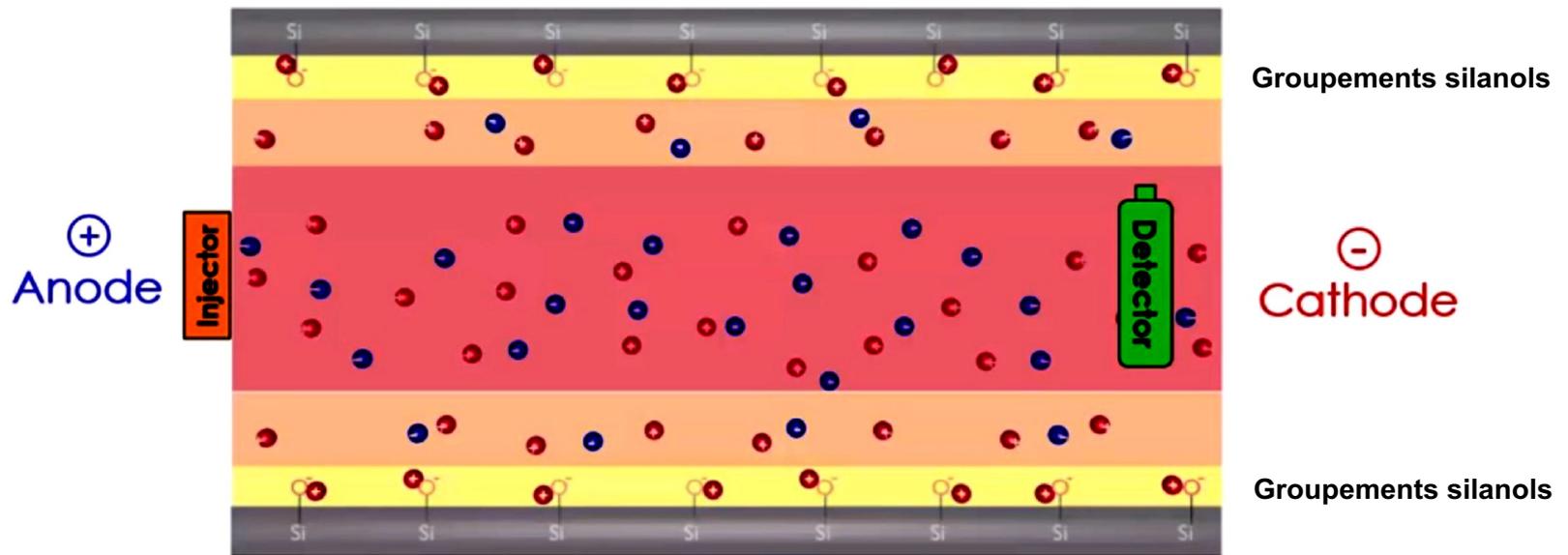


- Temps de rétention = temps écoulé entre l'injection et la détection à la sortie de la colonne > **Identification présomptive (fenêtres)**
- Aire sous le pic > **Quantification**

# Electrophorèse capillaire (EC)

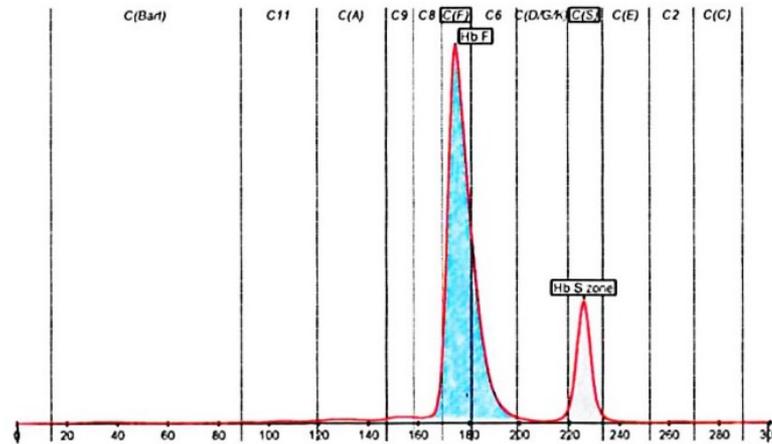


- Séparation dans un capillaire de silice contenant une solution tampon
- Une forte différence de potentiel (7000 volts) est appliquée aux bornes de chaque capillaire



- Les groupements silanols de la silice chargés négativement attirent les cations du tampon (en rouge) créant une double couche électrique. Sous l'effet du champ électrique, ces cations entraînent l'ensemble des molécules présentes dans la veinule axiale vers la cathode = **flux électro-osmotique**
- La vitesse de déplacement des analytes est fonction de leur charge et de leur masse

# Electrophorèse capillaire (EC)

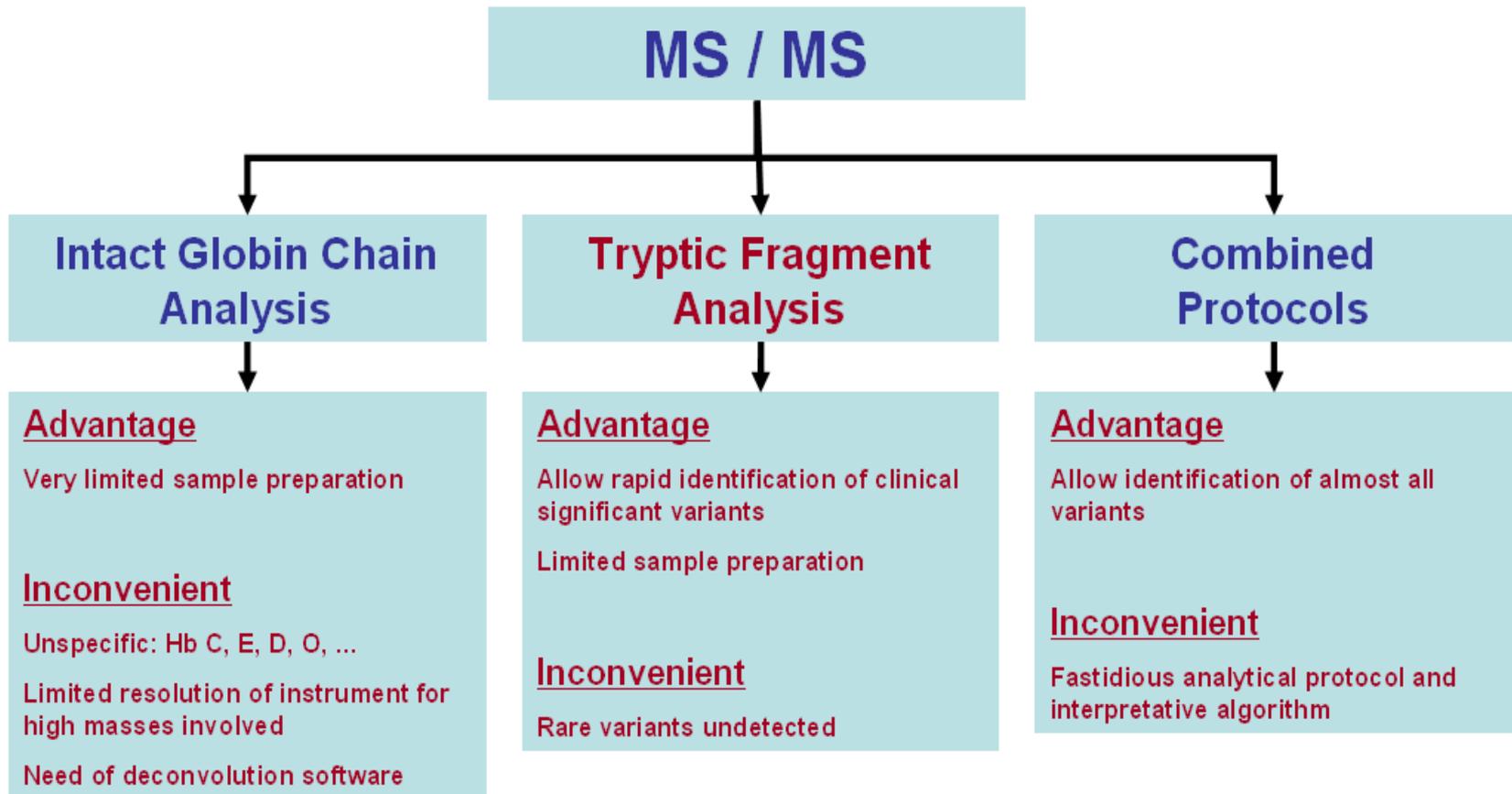


*Cord Blood Haemoglobin Electrophoresis*

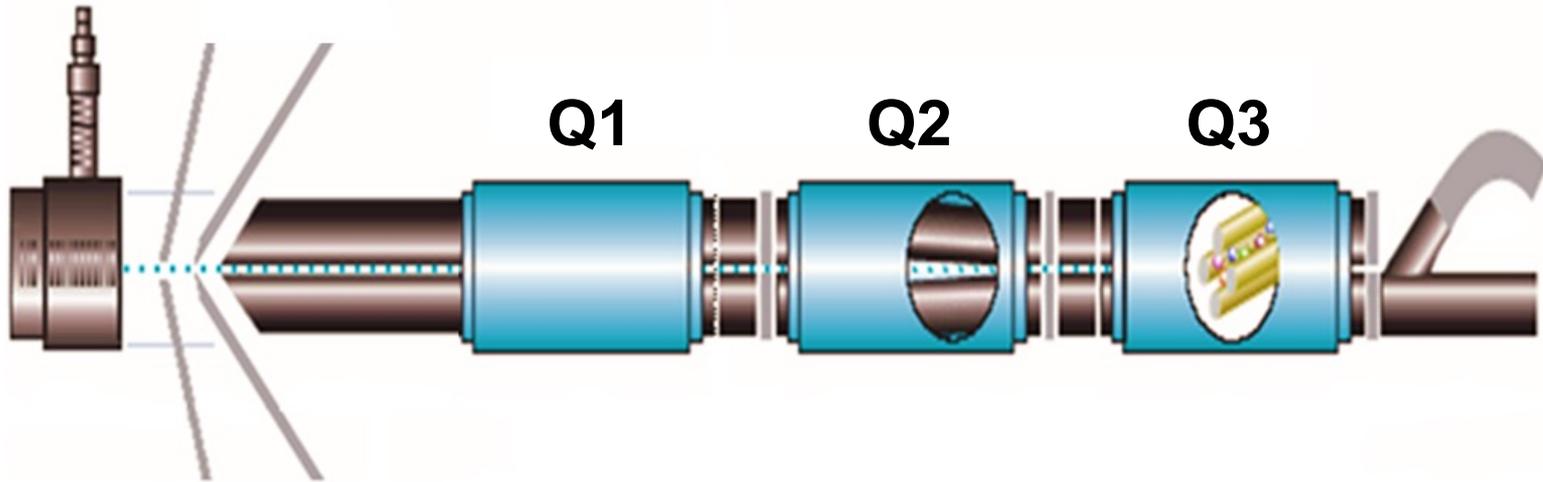
Name	%
Hb F	82,6
Hb S zone	17,4

- > Identification présumptive (zones)
- > Quantification (aire sous le pic)

# Spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)



# Multiple Reaction Monitoring (MRM)



Injection du produit digéré dans le système

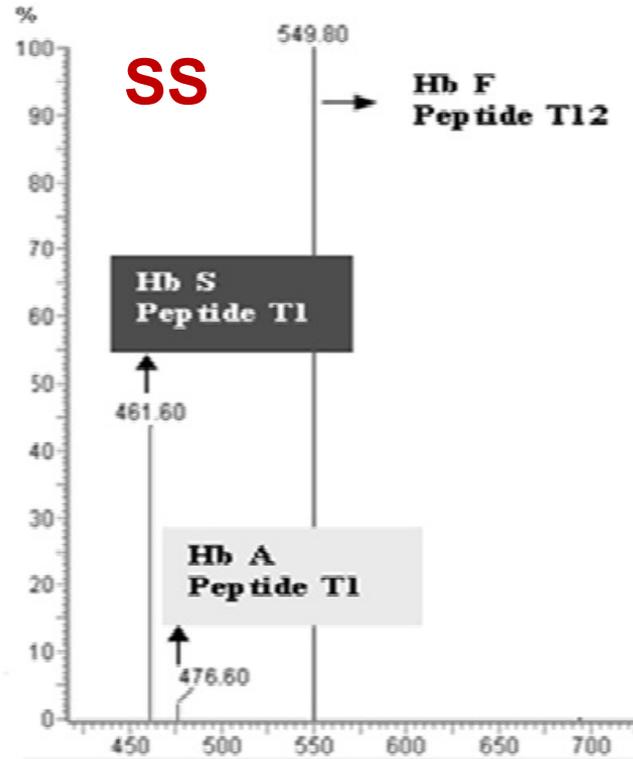
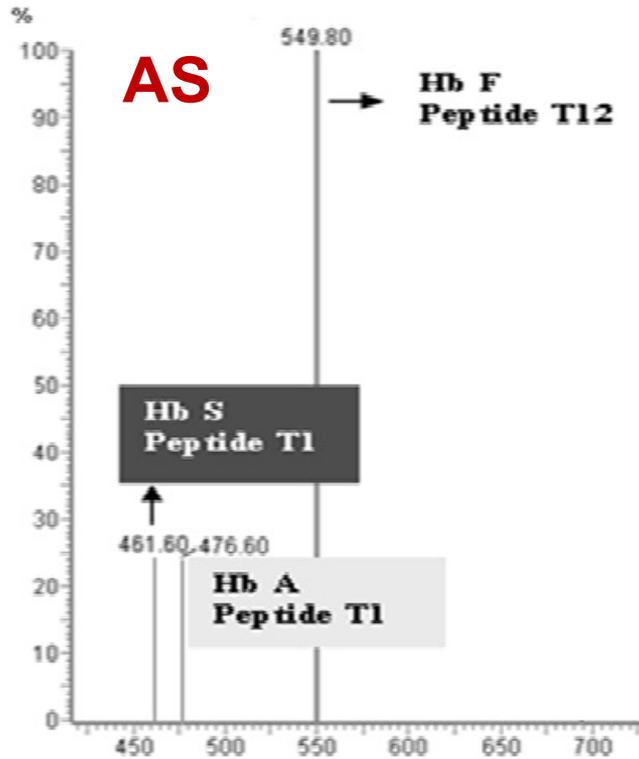
> analyse séquentielle des fragments tryptiques selon leur rapport masse/charge

**Q1:** 1<sup>ère</sup> analyse (sélection de tous les ions qui ont une masse d'intérêt)

**Q2:** chambre de collision (fragmentation des peptides sélectionnés)

**Q3:** 2<sup>ème</sup> analyse des produits de la fragmentation (meilleure spécificité)

# Multiple Reaction Monitoring (MRM) : Profiles



Ratios des peptides d'intérêt

Ratio Hb S/Hb A = 1 > bébé AS

Ratio Hb S/Hb A ~ 20 > bébé SS

Ratio Hb S/Hb A ~ 0 > bébé AA

## EC et HPLC

- Détection : **tous les variants** (y compris Hb Bart)
- Identification présumptive des variants les plus fréquents
- Nécessité de confirmer l'identification par une technique différente (risque de co-migration)
- Quantification des hémoglobines

## MS/MS

- Détection : variants les plus fréquents (**S, C, D, E, O**)
- Identification présumptive des variants les plus fréquents
- Nécessité de confirmer l'identification par une technique différente ?
- Ratios de fragments de peptides

## EC et HPLC

- Détection : tous les variants (y compris Hb Bart)
- Identification présomptive des variants les plus fréquents
- Nécessité de confirmer l'identification par une technique différente (risque de co-migration)
- Quantification des fractions
- $\alpha$  et  $\beta$ -thalassémies M (et m)

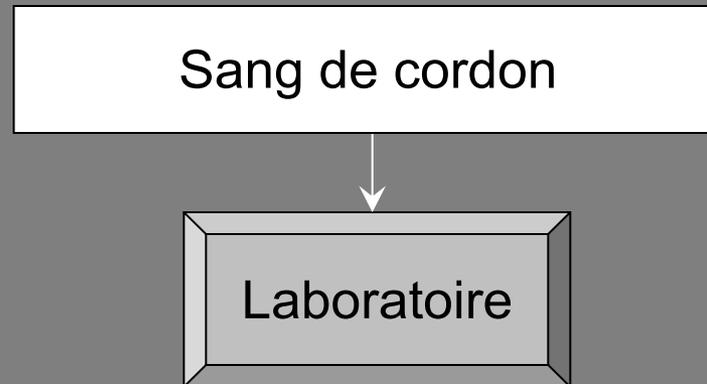
## MS/MS

- Détection : variants les plus fréquents (S, C, D, E, O)
- Identification présomptive des variants les plus fréquents
- Nécessité de confirmer l'identification par une technique différente (risque de co-migration)
- Ratios de fragments
- $\beta$ -thalassémies M

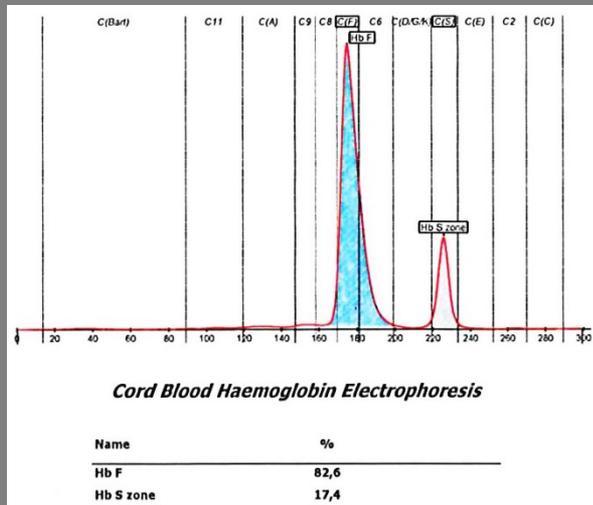
# Le point de vue du laboratoire

- Principes des techniques de dépistage de masse de la drépanocytose
- Organisation du dépistage de la drépanocytose jusqu'en 2022
- Statistiques du dépistage en Belgique jusqu'en 2022
- Le dépistage en 2023

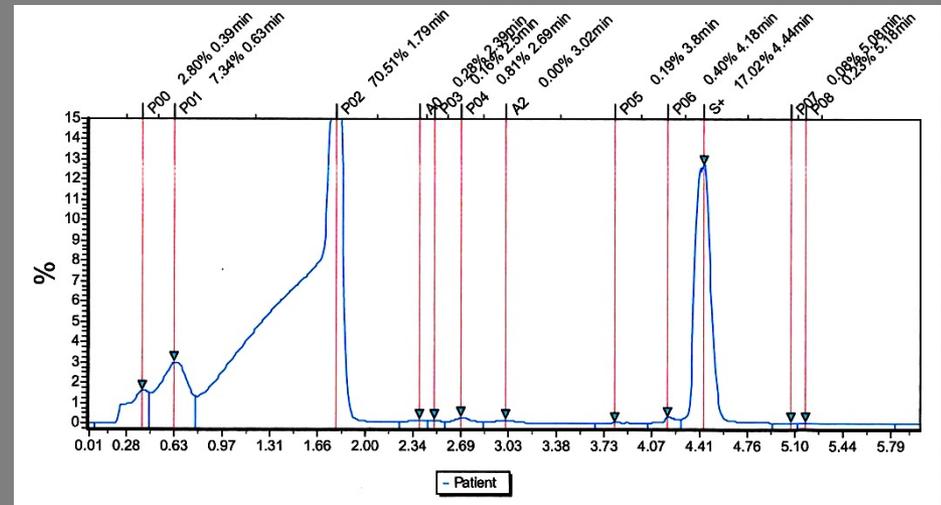
# Dépistage universel : organisation



## Première ligne (EC)



## Confirmation (HPLC)



## DEPISTAGE DES HEMOGLOBINOPATHIES

Non Facturable

N° de Prélèvement:

### Prélèvement:

3 ml - sang de cordon - Tube EDTA

Microtube EDTA accepté

Prélevée par:

Date:

Heure:

Sexe du Bébé: F M

### Identité du nouveau-né:

### Renseignements Généraux:

#### \* Champs obligatoires

\* Age gestationnel (semaines): 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32  
33 34 35 36 37 38 39 40 41 42

\* Poids:

kg: 1 2 3 4

100g: 1 2 3 4 5 6

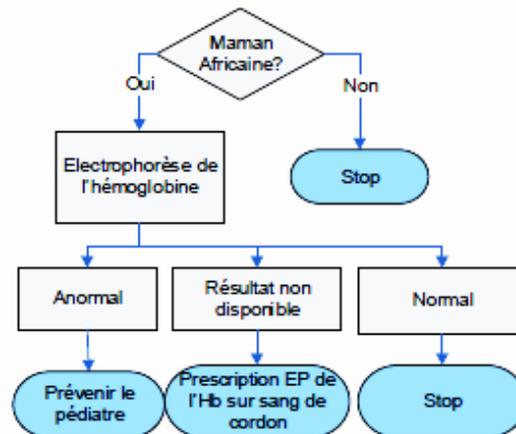
7 8 9

\* Notion de transfusion in utéro:

.....

MERE
Nom de la Mère:
.....
Pays d'origine:
.....

PÈRE
Nom du Père :
.....
Pays d'origine:
.....



Nom du gynécologue: .....

Nom du pédiatre: .....

Localisation: .....

Commentaires:

.....

.....

Date: .....

Signature du prescripteur:

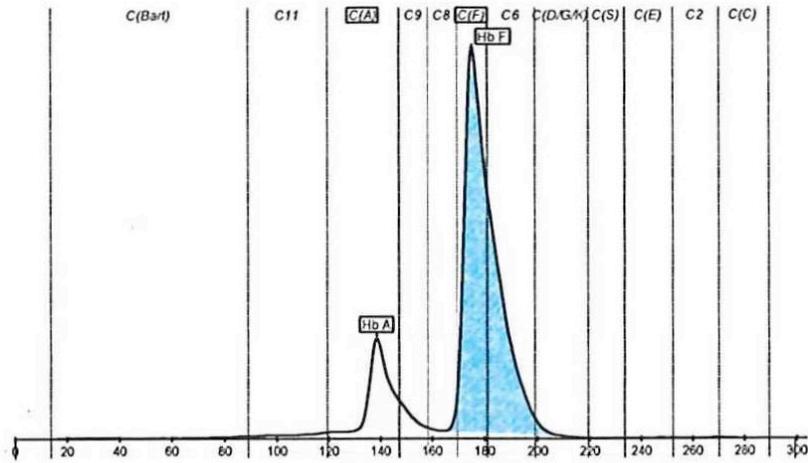
Informations complémentaires:

Laboratoire d'Hématologie

Dr O. Ketelslegers: 04/321 87 78

## Electrophorèse de l'hémoglobine: dépistage néonatal

Pas d'anomalie décelée

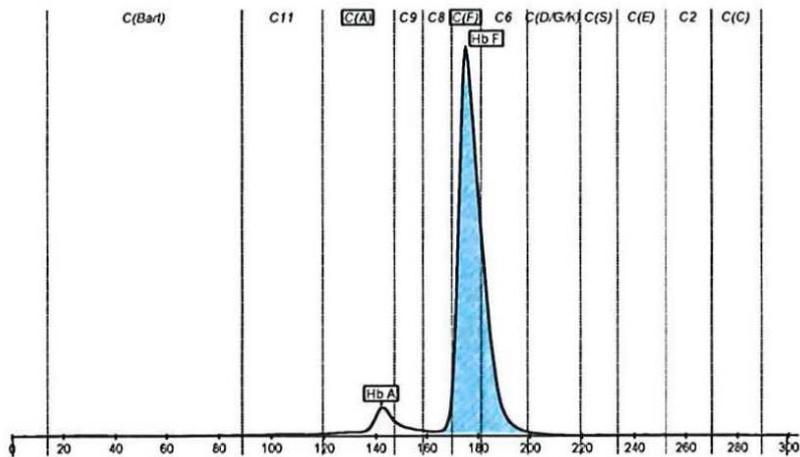


*Cord Blood Haemoglobin Electrophoresis*

Name	%
Hb A	15,8
Hb F	84,2

### Hémoglobines chez le nouveau-né

- Hb F 60-90%
- Hb A 10-40%
- Hb A2 peu ou pas



*Cord Blood Haemoglobin Electrophoresis*

Name	%
Hb A	4,8
Hb F	95,2

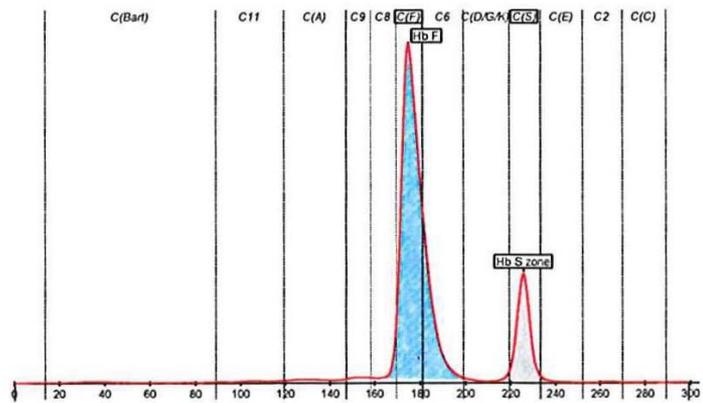
## Electrophorèse de l'hémoglobine: dépistage néonatal

Le dépistage néonatal ne met pas en évidence d'hémoglobine anormale. **Taux d'hémoglobine A cependant relativement faible : à mettre en rapport avec la prématurité très probablement.**

## Hémoglobines chez le nouveau-né

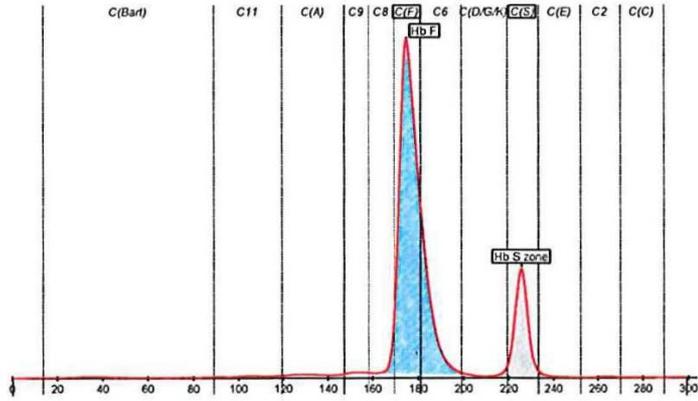
- Hb F 60-90%
- Hb A 10-40%
- Hb A2 peu ou pas

2101-60033



***Cord Blood Haemoglobin Electrophoresis***

Name	%
Hb F	82,6
Hb S zone	17,4



**Cord Blood Haemoglobin Electrophoresis**

Name	%
Hb F	82,6
Hb S zone	17,4

**Electrophorèse de l'hémoglobine: dépistage néonatal**

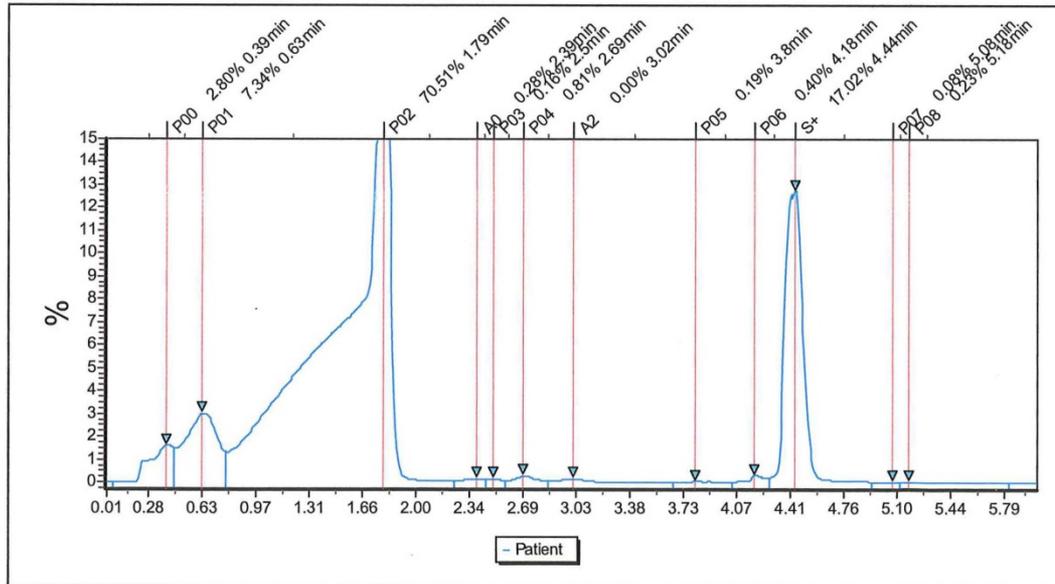
Séparation des Hb à pH 9.4: HbF + HbX (en position S)  
 Séparation des Hb par HPLC: HbF + HbX (en position S)

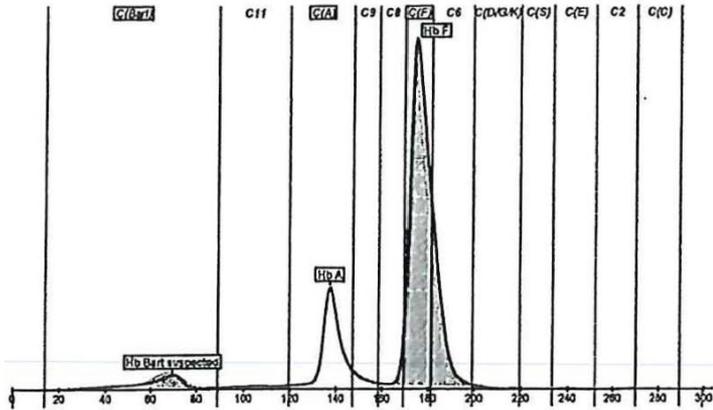
**Profil compatible avec une Hb S à l'état homozygote ou une hétérozygotie composée S/béta<sup>0</sup>-thalassémie.**

Des mesures préventives qui permettent une réduction très significative de la mortalité et de la morbidité au cours des cinq premières années de vie peuvent instaurées :

- le programme vaccinal
- la prophylaxie des infections pneumococciques par la pénicillinothérapie
- l'éducation sanitaire, particulière à ces maladies
- le conseil génétique aux parents

Un prélèvement de contrôle de l'enfant et, si cela n'a déjà été fait, des parents est nécessaire afin de confirmer ce diagnostic.





**Cord Blood Haemoglobin Electrophoresis**

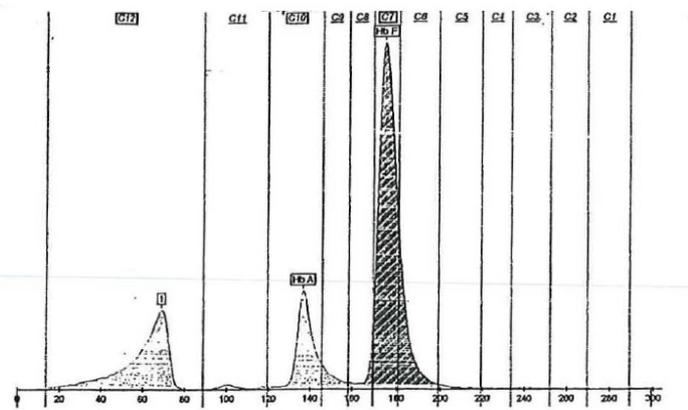
Name	%
Hb Bart suspected	6,6
Hb A	17,6
Hb F	78,0

**Electrophorèse de l'hémoglobine: dépistage néonatal**

Le dépistage néonatal met en évidence la présence de l'hémoglobine Bart. Présence par ailleurs d'hémoglobines A et F. L'hémoglobine Bart peut se retrouver normalement à la naissance. On ne peut exclure cependant, dans ce cas, le diagnostic d'alpha-thalassémie mineure. Un contrôle ultérieur et une enquête familiale sont conseillés.

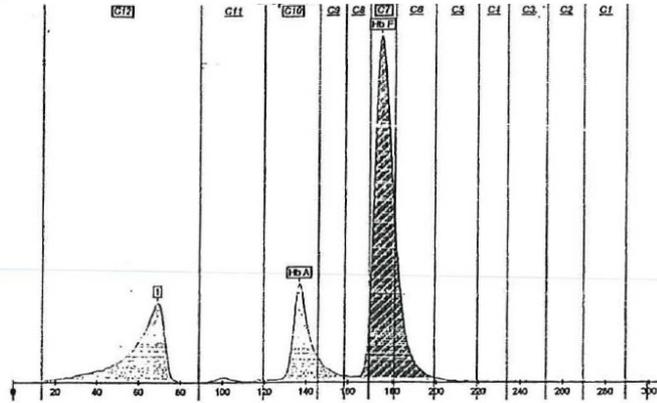
Mère avec profil compatible avec le diagnostic d'alpha-thalassémie mineure.

1210-49476



<b>Fractions</b>	<b>%</b>	<b>Norm. %</b>
------------------	----------	----------------

<b>1</b>	<b>24,7</b>	
<b>Hb A</b>	<b>14,9</b>	
<b>Hb F</b>	<b>60,4</b>	



### Electrophorèse de l'hémoglobine: dépistage néonatal

Séparation des Hb par IEF: HbF + HbA + HbX (multiples bandes en position Bart)  
 Séparation des Hb à pH 9.4: HbF + HbA + HbX (pic important en position Bart (24.7%)  
 Séparation des Hb à pH 4.6: HbF + HbA (HbX non séparée)

Présence d'Hb A (14.9%) et d'Hb F (60.4%).

On note la présence d'Hb Bart en proportion importante.

**Exclure le diagnostic d'hémoglobinose H (profil suspect).**

Un prélèvement de contrôle de l'enfant et des parents est nécessaire afin de confirmer ce diagnostic.

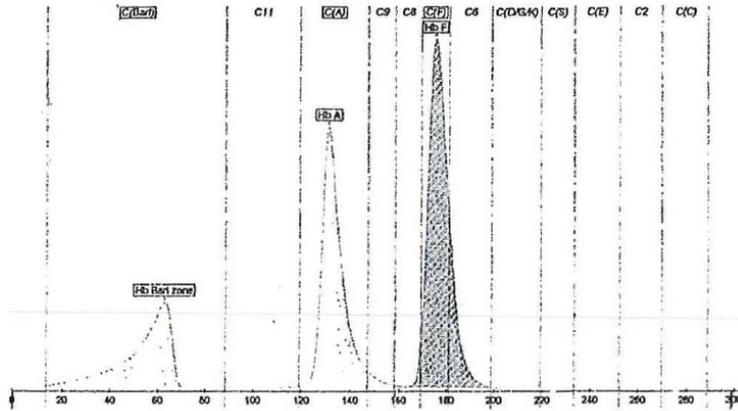
### Génétique:

Sur le gène de l'hémoglobine a mis en évidence 3 délétions alpha compatibles avec le diagnostic d'hémoglobinose H. - La grande délétion qui emporte 2 gènes est probablement la Dutch1.

Mère avec profil suspect d'alpha-thalassémie mineure.

Génétique: Présence d'une alpha-thalassémie mineure probablement de génotype aa/-- Dutch 1.

Fractions	%	Norm. %
<b>1</b>	<b>24,7</b>	
<b>Hb A</b>	<b>14,9</b>	
<b>Hb F</b>	<b>60,4</b>	



**Electrophorèse de l'hémoglobine: dépistage néonatal**

Séparation des Hb en IEF: HbF + HbA + Hb Bart

Séparation des Hb à pH 9.4: HbF + HbA + HbX (pic important en position Bart (16.3%))

Séparation des Hb par HPLC: HbF + HbA + HbX (pic important en position Bart)

Présence d'Hb A (34.8%) et d'Hb F (48.9%).

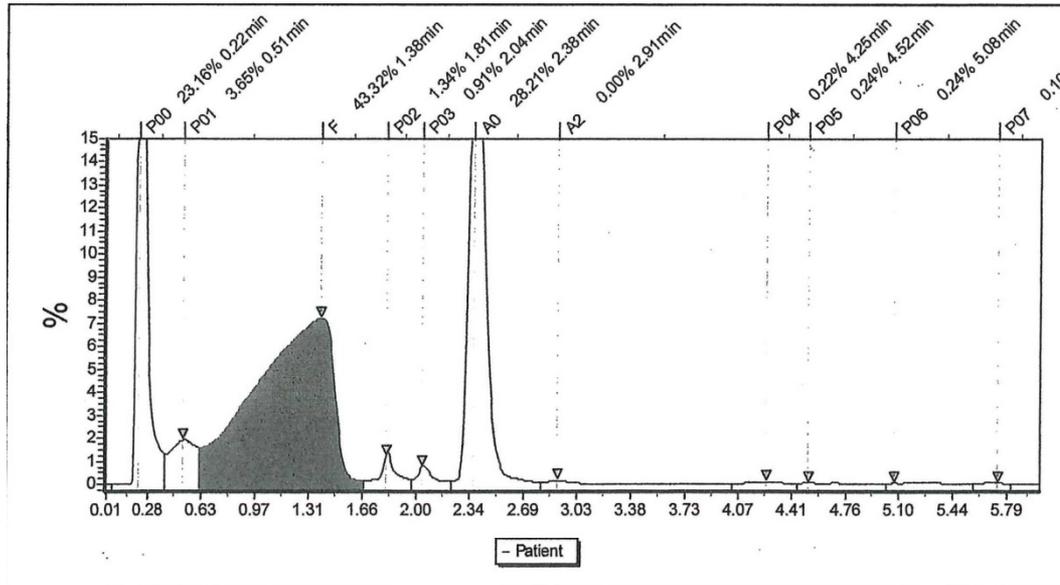
On note la présence d'Hb Bart en proportion importante (16.3%). Exclure le diagnostic d'hémoglobinose H (profil suspect).

Un prélèvement de contrôle de l'enfant et des parents est nécessaire afin de confirmer ce diagnostic (chez la mère, diagnostic d'alpha-thalassémie mineure non exclu sous réserve de carence martiale (réf. 1403-67263)).

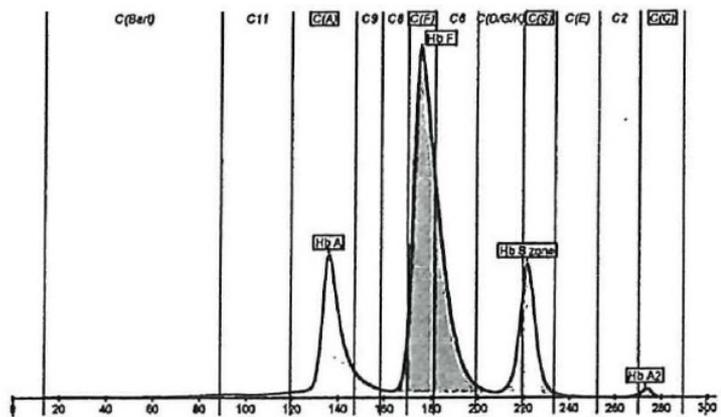
Fract.	%	Val.Norm. %
<b>Hb Bart zone</b>	<b>16,3</b>	
<b>Hb A</b>	<b>34,8</b>	
<b>Hb F</b>	<b>48,9</b>	

**Génétique:**

Présence d'une délétion de trois gènes alpha (génotype -a3.7/--Dutch1 ou -a3.7/--MED2).  
Donc bien une hémoglobinose H de type délétionnelle.

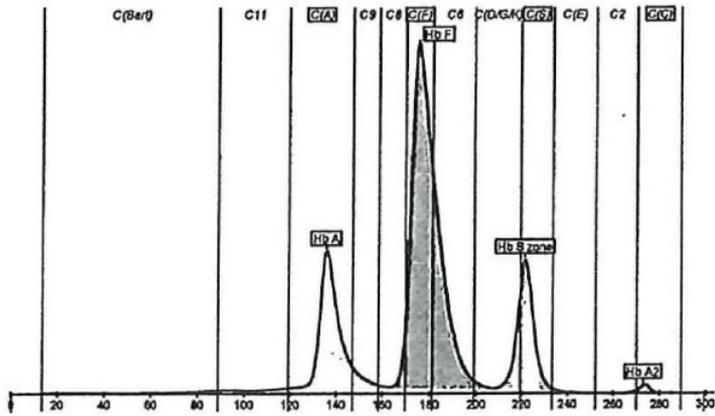


2003-60022



***Cord Blood Haemoglobin Electrophoresis***

<b>Nome</b>	<b>%</b>
Hb A	10,4
Hb F	64,1
Hb S zone	15,9
Hb A2	0,6



**Electrophorèse de l'hémoglobine: dépistage néonatal**

Séparation des Hb à pH 9.4: HbF + HbA + HbX (en position D)

Séparation des Hb par HPLC: HbF + HbA + HbX (en position A2)

**Profil compatible avec un variant de l'hémoglobine à l'état hétérozygote : Hb D-Iran probable (autre variant rare de l'Hb non exclu) (asymptomatique).**

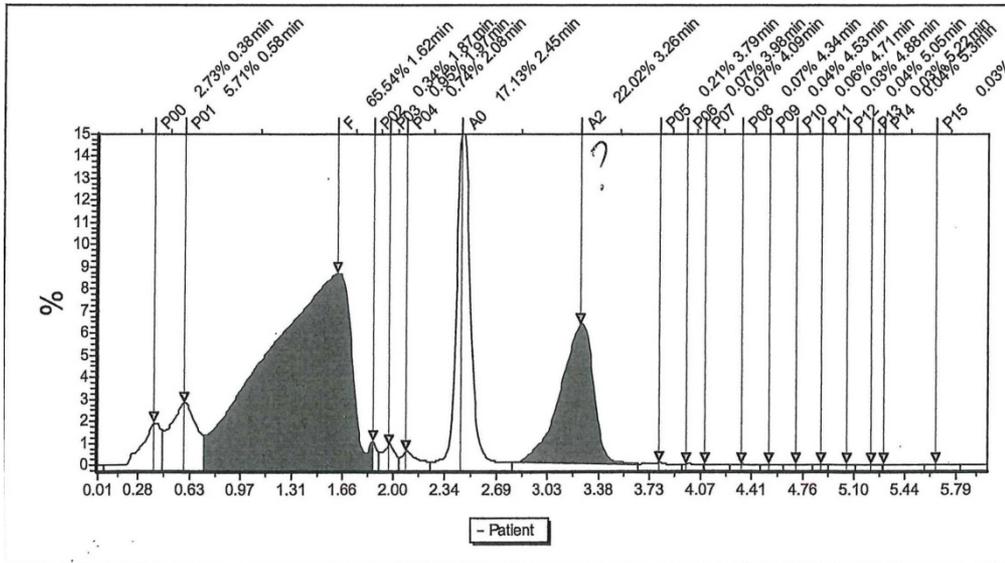
Un contrôle vers l'âge de trois mois est conseillé.

Identification précise du variant à la demande.

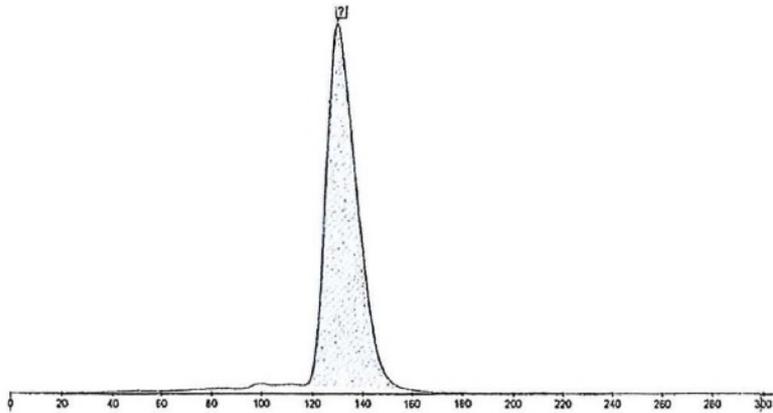
Mère: Profil normal.

**Cord Blood Haemoglobin Electrophoresis**

Nome	%
Hb A	19,4
Hb F	64,1
Hb S zone	15,9
Hb A2	0,6



1602-70960

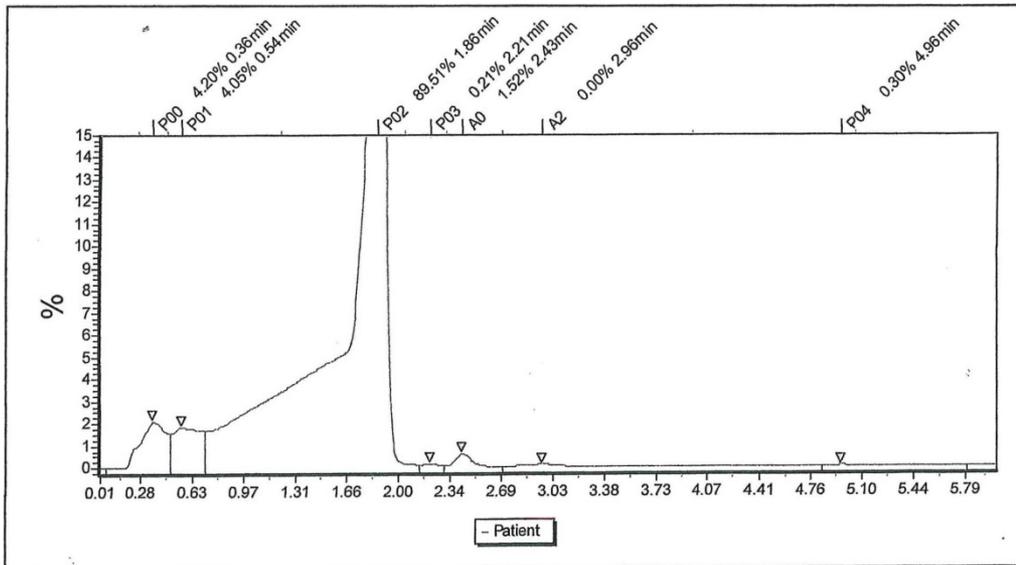


Electrophorèse de l'hémoglobine: dépistage néonatal

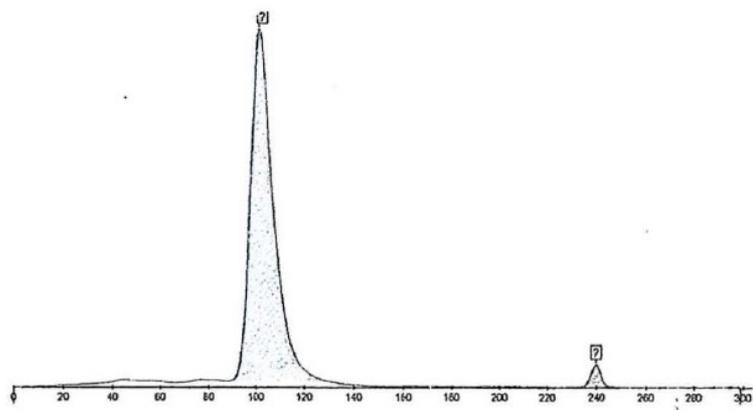
**Profil compatible avec le diagnostic de bêta-thalassémie majeure.**

Diagnostic prénatal connu de bêta-thalassémie majeure (2 parents porteurs).

Fract.	%	Val.Norm. %
?	100,0	



1602-71208



**Electrophorèse de l'hémoglobine: dépistage néonatal**

**Profil non contributif vu les transfusions in utero (profil électrophorétique "adulte": Hb A + Hb A2).**

**Contrôle ultérieur souhaitable (> 2 mois).**

<b>Fract.</b>	<b>%</b>	<b>Val.Norm. %</b>
?	<b>97,5</b>	
?	<b>2,5</b>	

# Dépistage et puis ...

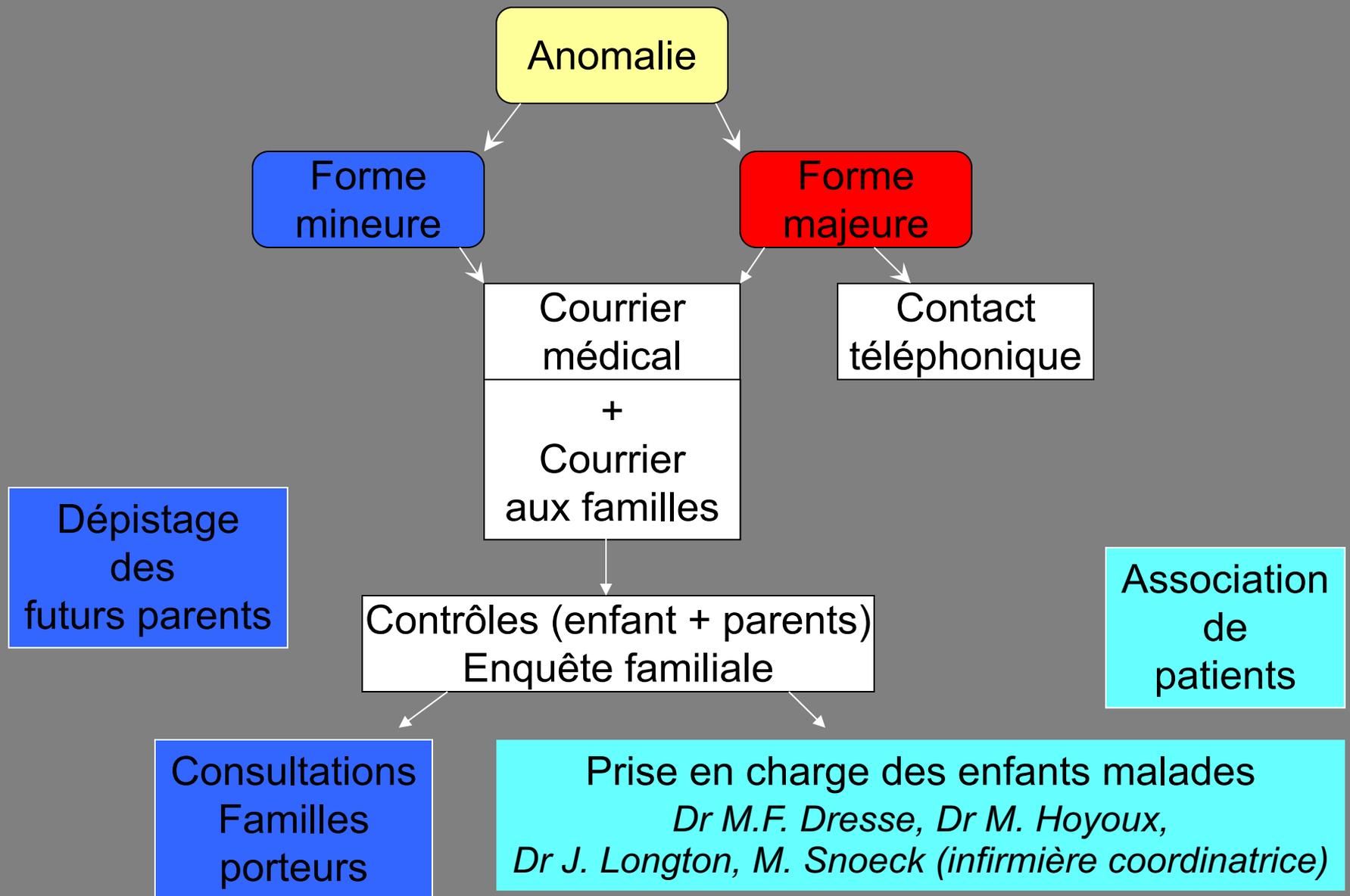
Les **résultats pathologiques** sont communiqués sans délai au pédiatre hématologue référent qui contacte la famille et organise le suivi (antibiothérapie prophylactique, vaccinations, éducation des parents...).

Ils sont systématiquement vérifiés sur un prélèvement de sang veineux.

Pour les cas d'**hétérozygotie - porteurs sains** d'un variant de l'hémoglobine -, le service de la maternité informe la famille et le pédiatre de l'enfant et propose un rendez-vous à la consultation du pédiatre hématologue référent vers l'âge de 3 mois.

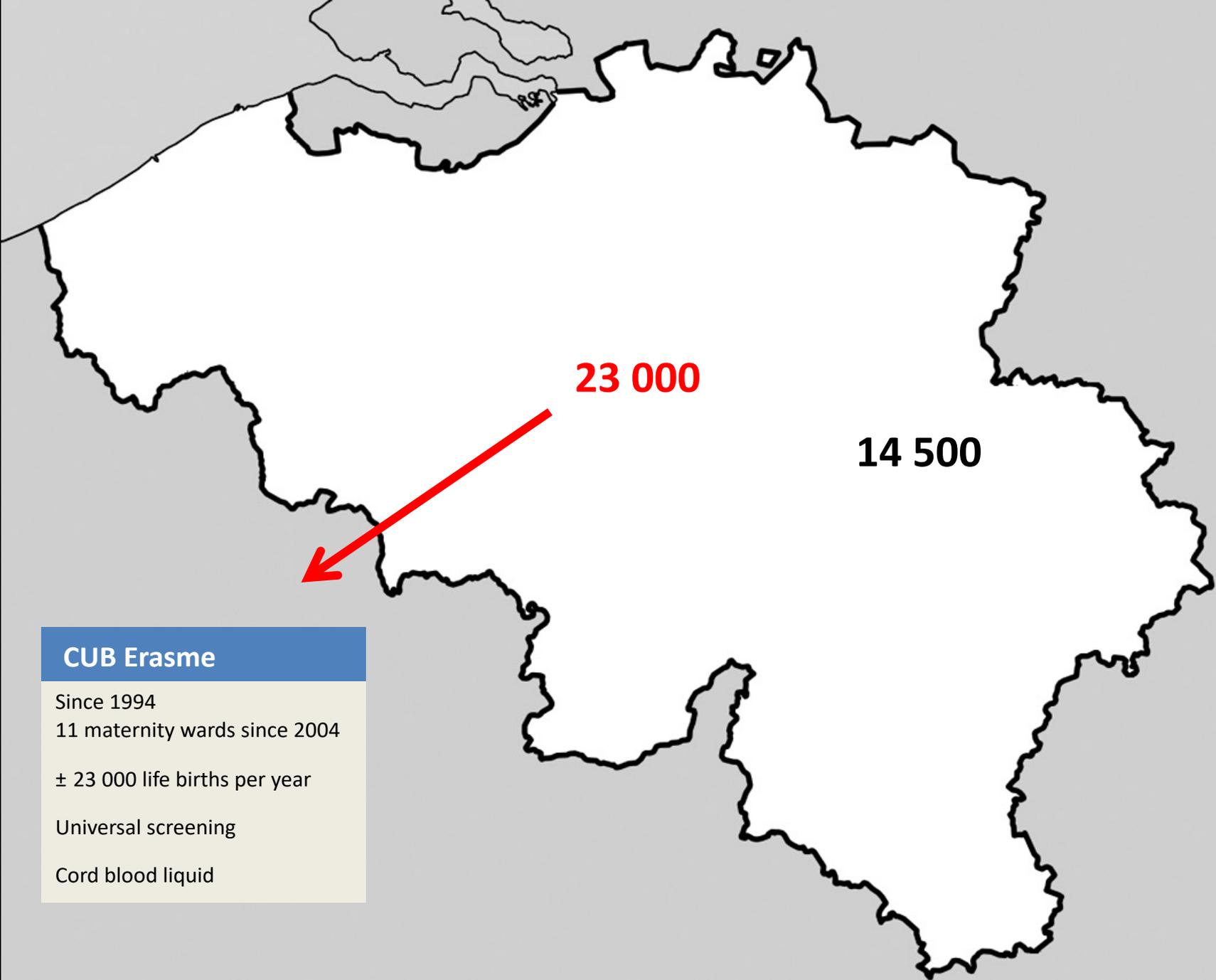
Une enquête familiale est conseillée dans tous les cas.

# Dépistage et puis ...



# Le point de vue du laboratoire

- Principes des techniques de dépistage de masse de la drépanocytose
- Organisation du dépistage de la drépanocytose jusqu'en 2022
- **Statistiques du dépistage en Belgique jusqu'en 2022**
- Le dépistage en 2023



### CUB Erasme

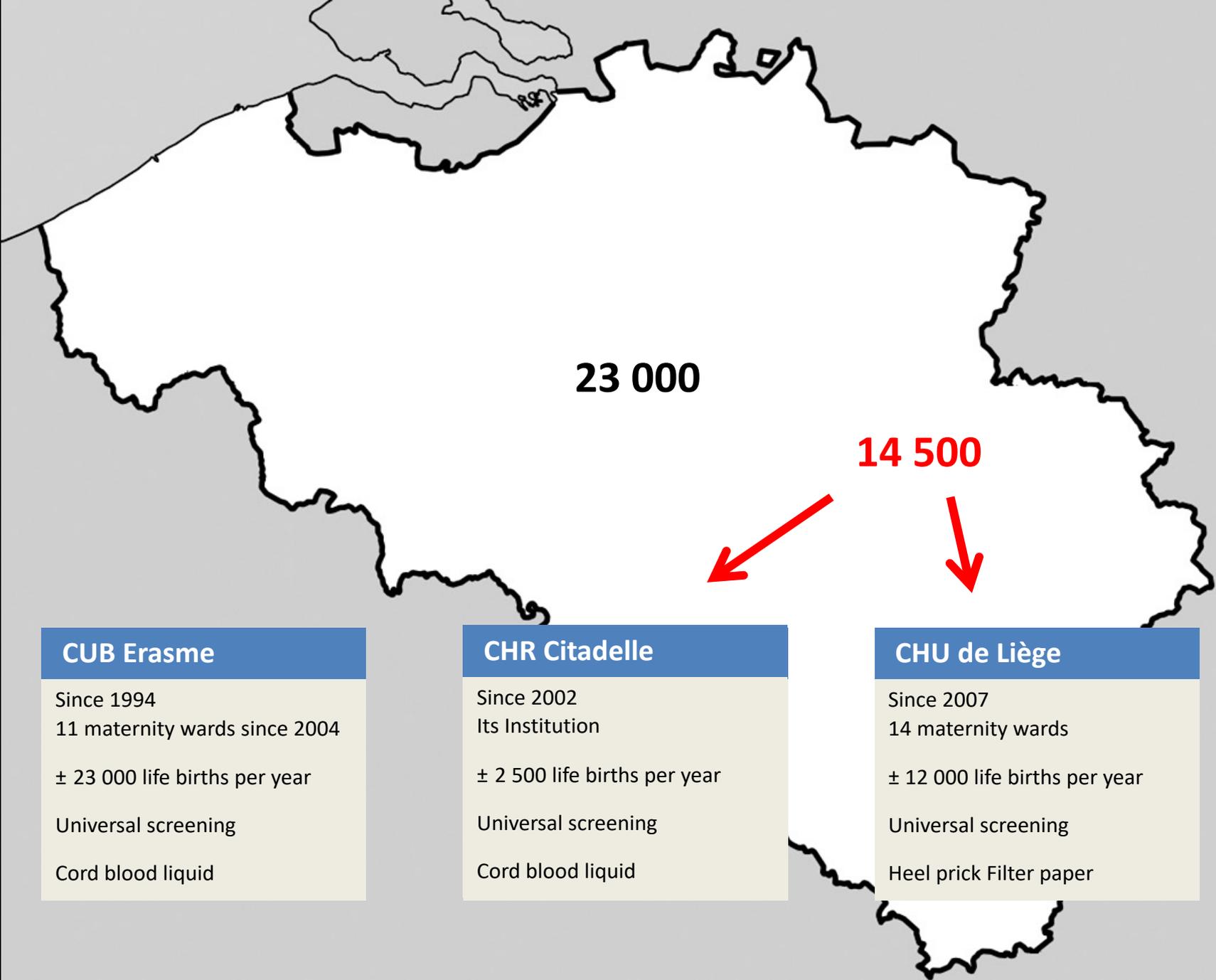
Since 1994

11 maternity wards since 2004

± 23 000 life births per year

Universal screening

Cord blood liquid



23 000

14 500

### CUB Erasme

Since 1994  
11 maternity wards since 2004  
± 23 000 life births per year  
Universal screening  
Cord blood liquid

### CHR Citadelle

Since 2002  
Its Institution  
± 2 500 life births per year  
Universal screening  
Cord blood liquid

### CHU de Liège

Since 2007  
14 maternity wards  
± 12 000 life births per year  
Universal screening  
Heel prick Filter paper

# Epidemiological data on sickle cell disease in Belgium

Olivier Ketelslegers<sup>1</sup>, François Eyskens<sup>2</sup>,  
François Boemer<sup>3</sup>, Vincent Bours<sup>3</sup>, Jean-Marc Minon<sup>1</sup> and  
Béatrice Gulbis<sup>4</sup>

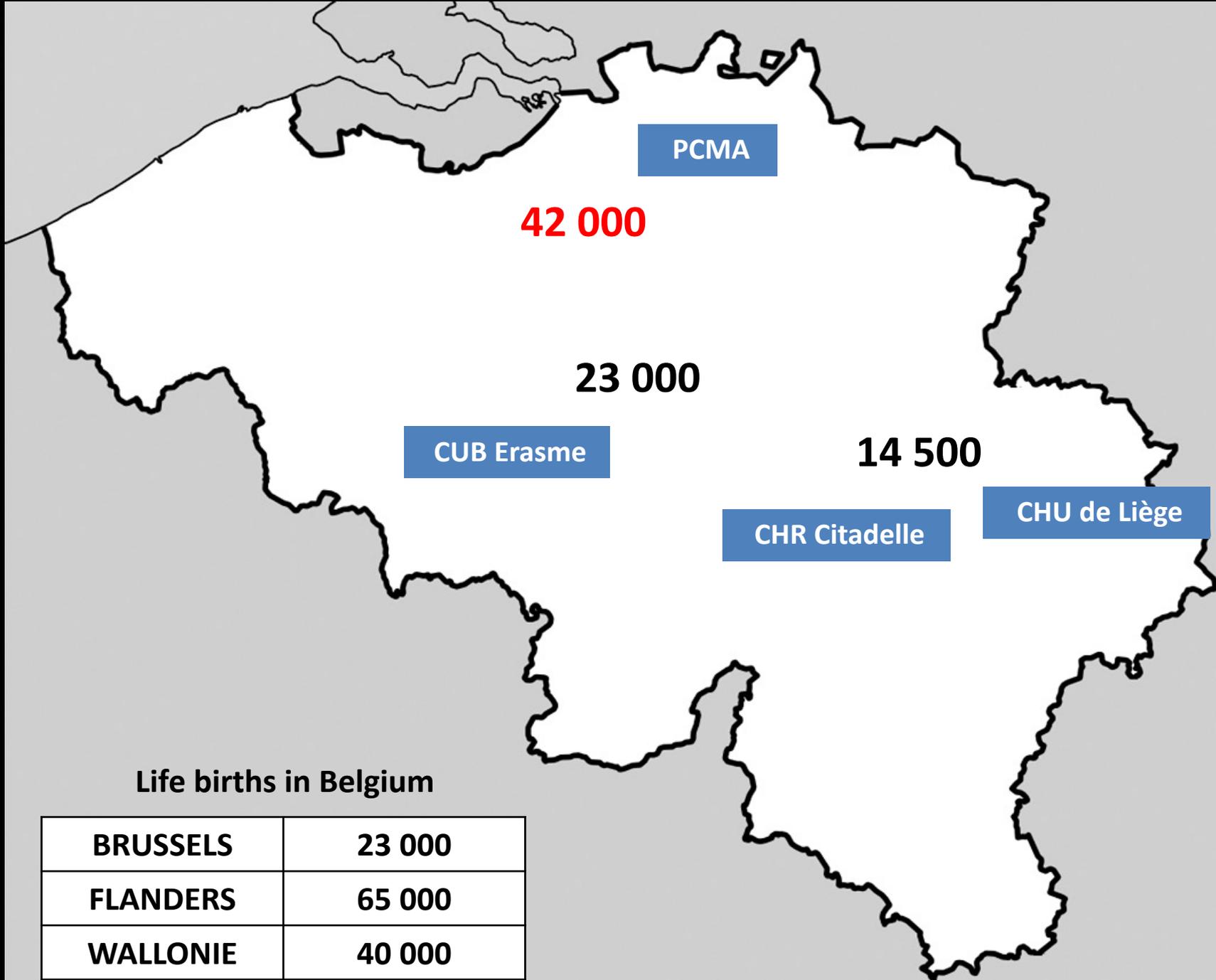
<sup>1</sup> Department of Laboratory Medicine, Centre Hospitalier Régional de la Citadelle, Liège, Belgium

<sup>2</sup> Departement Welzijn, Economie & Plattelandsbeleid, PCMA vzw, UZA, Antwerpen, Belgium

<sup>3</sup> Centre de Génétique Humaine, CHU, University of Liège, Belgium

<sup>4</sup> Department of Clinical Chemistry, Hopital Erasme U.L.B, Brussels, Belgium

Fund : RIZIV/INAMI



PCMA

42 000

23 000

CUB Erasme

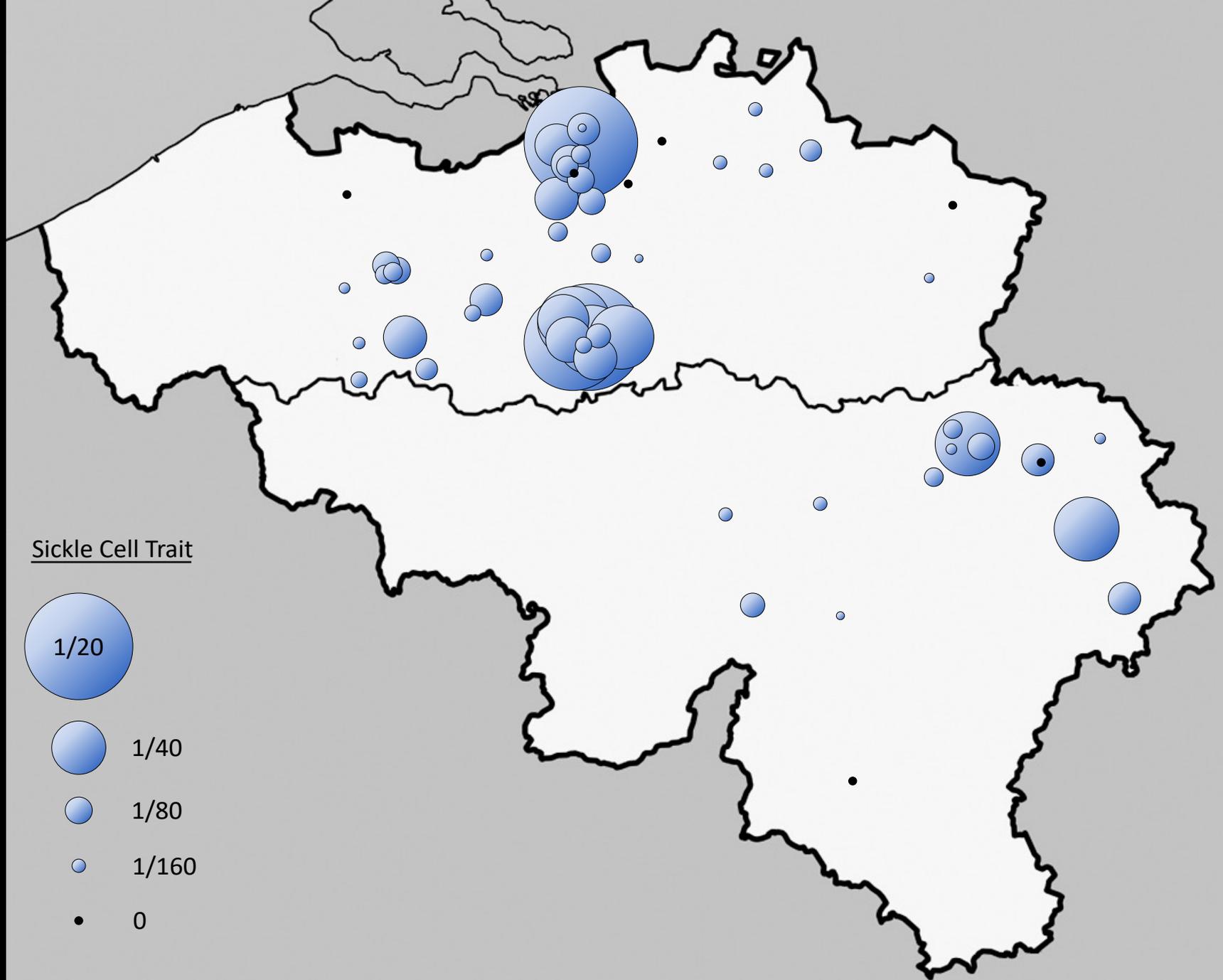
14 500

CHR Citadelle

CHU de Liège

Life births in Belgium

BRUSSELS	23 000
FLANDERS	65 000
WALLONIE	40 000



Sickle Cell Trait



# Pilot study (July-December 2013)

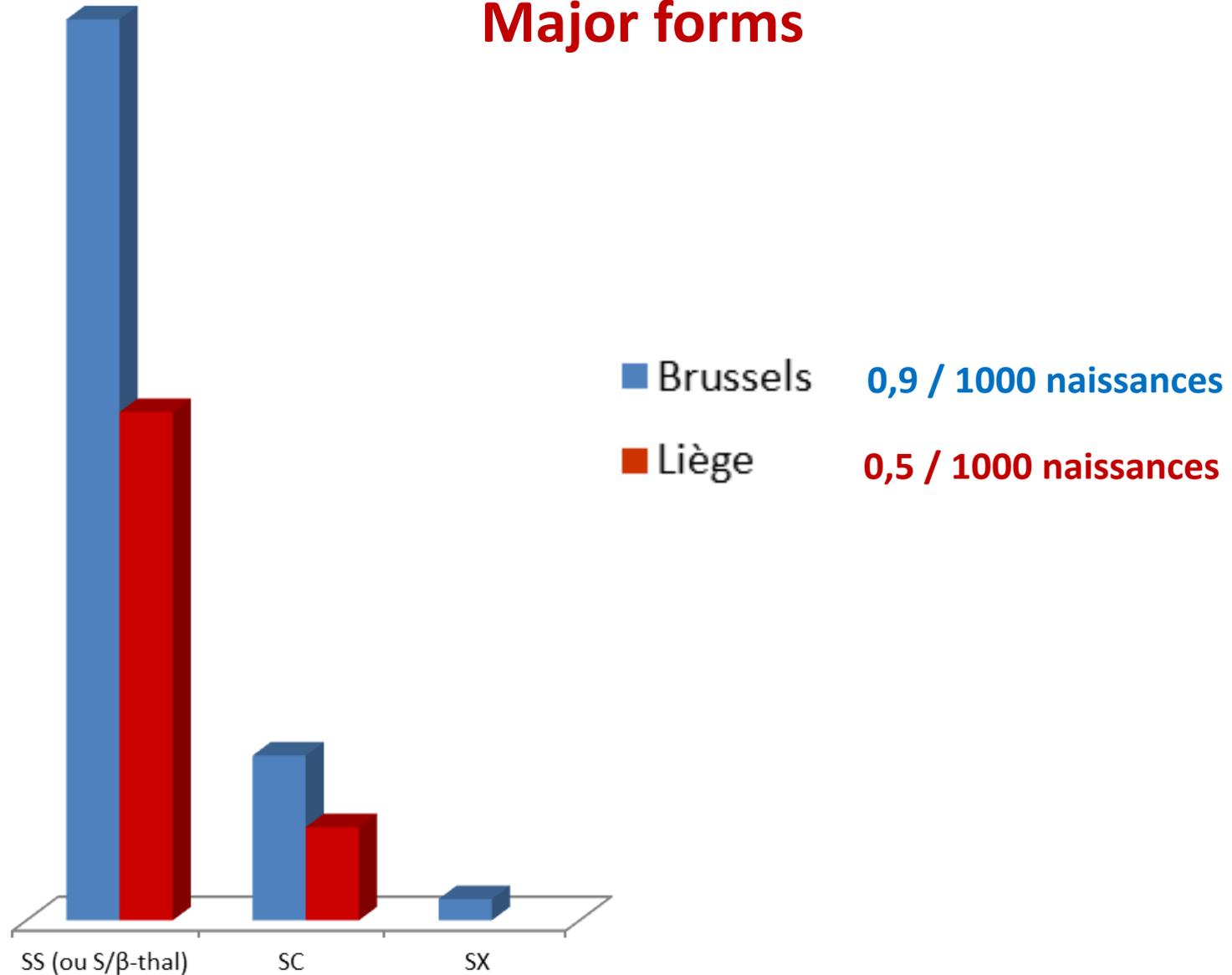
*Comparison between incidences for SCD and metabolic diseases part of the mandatory neonatal screening*

	PCMA		CHU Liège	
	Incidences (since 1968)	Study 2013 (newborns/6months)	Incidences (since at least 2007)	Study 2013 (newborns/6months)
<b>Sickle Cell Disorder</b>	-	<b>8</b>	<b>1/3,600</b>	<b>2</b>
<b>Phenylketonuria/hyperphenylalaninemia</b>	1/16,465	1	1/6,924	2
<b>Congenital hypothyroidism</b>	1/4,311	2	1/3,865	0
<b>Congenital adrenal hyperplasia</b>	1/17,553	0		
<b>Biotinidase deficiency</b>	1/34,981	1		
<b>MCAD</b>	1/15,025	2	1/18,333	0
<b>MADD</b>	1/375,624	0	0 since 2007	0
<b>Glutaric acidemia type I</b>	1/375,624	0	0 since 2007	0
<b>Isovaleric acidemia</b>	1/187,812	0	0 since 2007	0
<b>Maple syrup urine disease (leucinosis)</b>	1/375,624	0	1/380,000	0
<b>Methylmalonic acidemia</b>	1/125,208	0	0 since 2007	0
<b>Propionic acidemia</b>	1/375,624	0	0 since 2007	0

*MCAD: medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency; MADD: multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency*

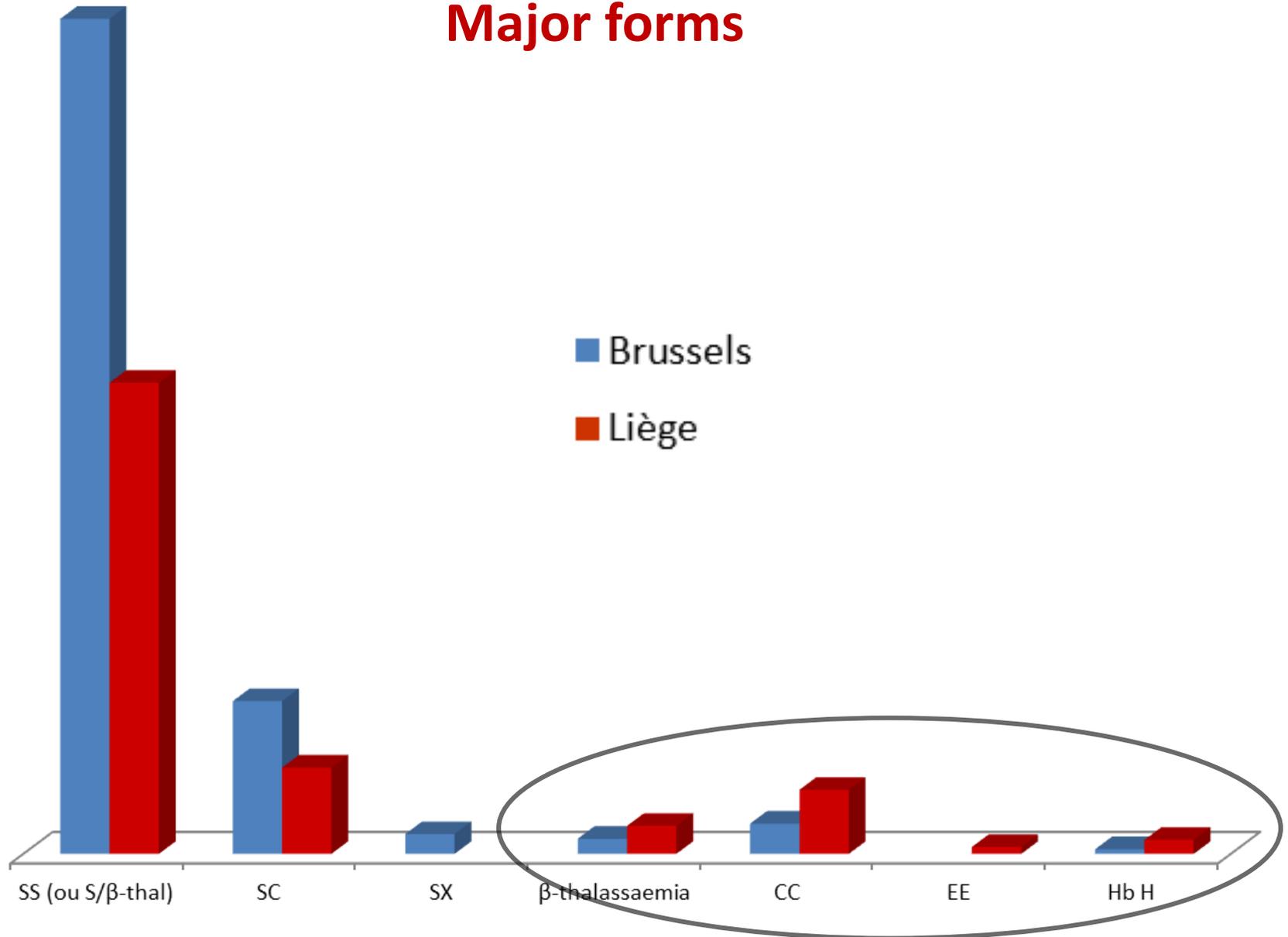
Incidence (2011-2020) *Neonatal screening results by centre*

## Major forms

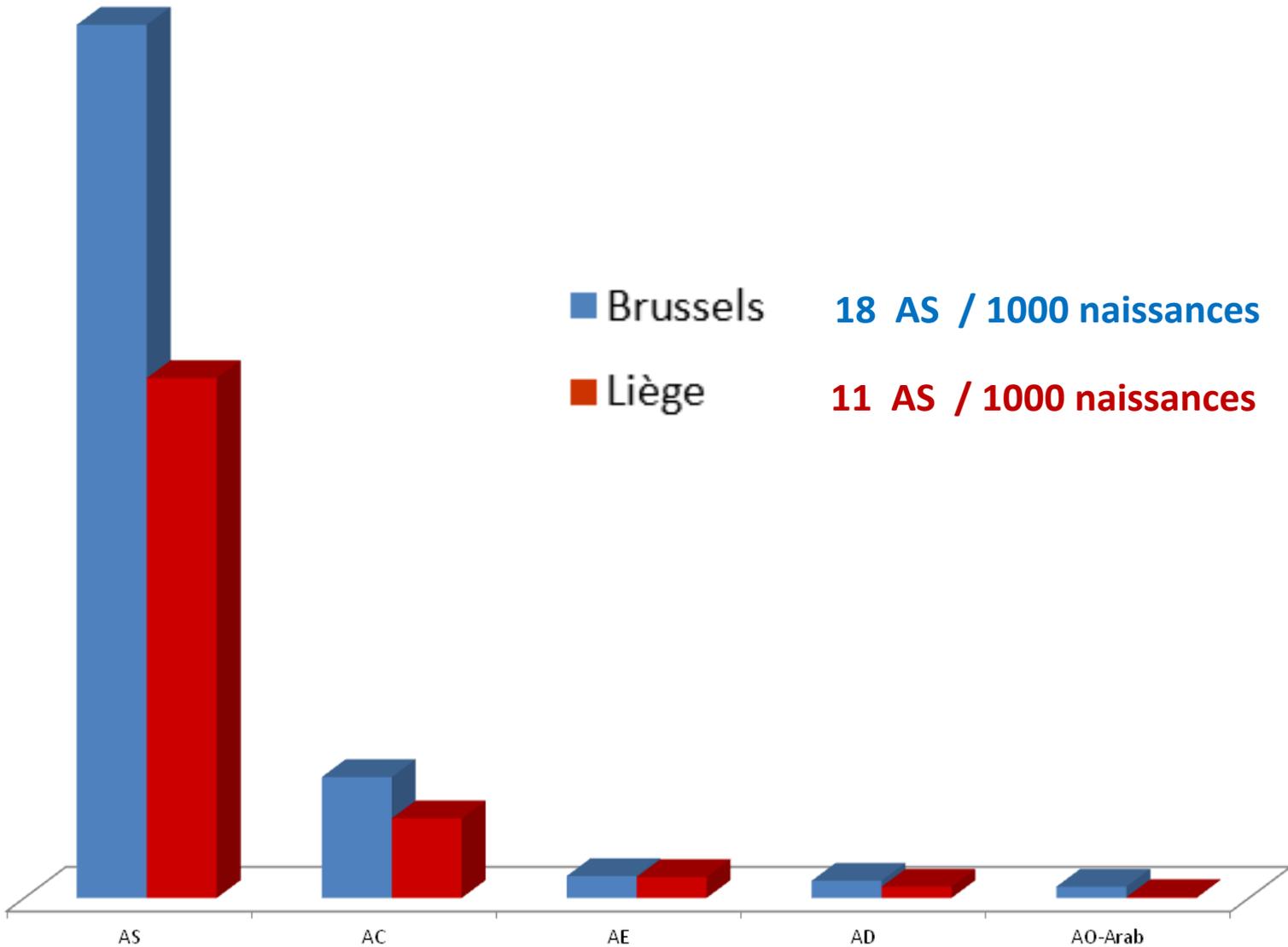


Incidence (2011-2020) *Neonatal screening results by centre*

## Major forms



## Minor forms



## Distribution by year of neonates screened with SCD or heterozygous for haemoglobin S (2009-2022)

Year	Neonates screened All Regions (N)	SCD All Regions (N)	SCD All Regions Incidence	AS Brussels Region (N)	AS Brussels Region Incidence	AS Liege Region (N)	AS Liège Region Incidence
2009	40026	25	1/1601	421	1/54	159	1/109
2010	40579	25	1/1561	449	1/52	150	1/115
2011	40262	36	1/1088	458	1/50	112	1/154
2012	40675	24	1/1768	460	1/51	175	1/98
2013	40241	22	1/1829	520	1/45	161	1/104
2014	40144	28	1/1487	447	1/52	192	1/87
2015	39748	27	1/1529	449	1/52	174	1/94
2016	39292	25	1/1572	504	1/46	200	1/82
2017	37364	35	1/1068	503	1/42	193	1/83
2018	38451	27	1/1424	484	1/47	174	1/90
2019	38425	24	1/1601	501	1/44	191	1/85
2020	36441	28	1/1301	477	1/44	182	1/84
2021	34636	32	1/1082	385	1/50	191	1/80
2022	35030	24	1/1460	458	1/44	190	1/77
<b>Total</b>	<b>541314</b>	<b>382</b>	<b>1/1355</b>	<b>4211</b>	<b>1/49</b>	<b>2444</b>	<b>1/91</b>

# Le point de vue du laboratoire

- Principes des techniques de dépistage de masse de la drépanocytose
- Organisation du dépistage de la drépanocytose en Belgique jusqu'en 2022
- Statistiques du dépistage jusqu'en 2022
- Le dépistage en 2023

## Le dépistage en 2023 par MS/MS

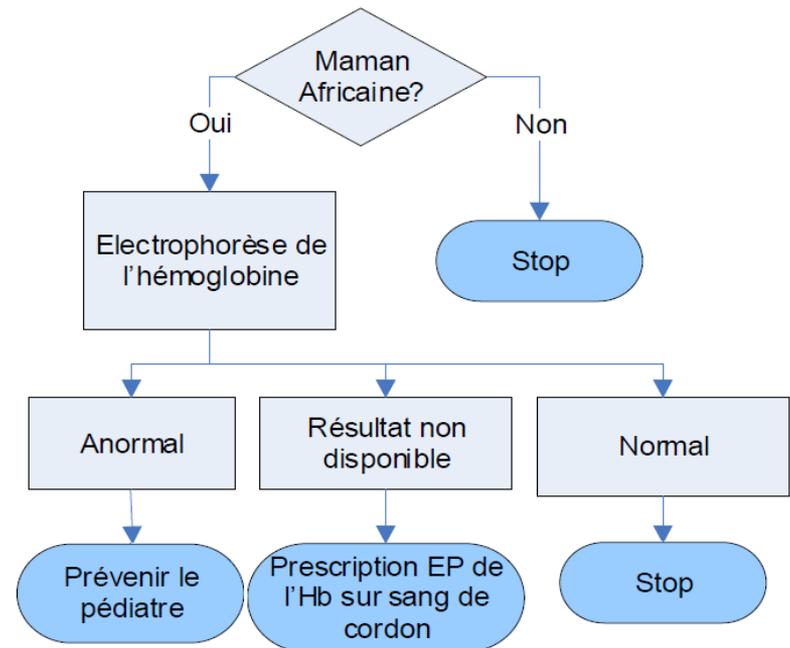
- Avant janvier 2023, nous reportions toutes les formes précitées: SS, SC, SE, SO, SD, AS, AC, AE, AD, AO, CC, EE, DD, OO, B-thal majeure... Toutes ces formes étaient confirmées par analyse moléculaire sur le buvard du dépistage.
- Depuis l'officialisation du programme de dépistage, nous ne rendons plus que les bébés malades : SS, SC, SE, SO, SD. Nous ne réalisons plus de confirmation moléculaire (étant donné que la méthode de screening a démontré depuis > 10 ans sa très bonne spécificité). C'est aujourd'hui la responsabilité de la maternité de réaliser une confirmation par électrophorèse de Hb sur un prélèvement indépendant (ce prélèvement indépendant permet de confirmer par ailleurs qu'il n'y a pas eu d'interversion d'échantillon / patient lors du dépistage).
- TAT: 7 jours (on réalise l'analyse une fois par semaine).

# Prescription ciblée d'une EP sur sang de cordon au CHR de la Citadelle (janvier-mai 2023)

> nouveaux-nés de mamans originaires d'Afrique sub-saharienne avec variant ou sans EP d'hémoglobine

145 bébés testés (10% des naissances)

- └ **19 bébés porteurs AS**  
(7 Hb Bart: 1,1-5,6% Hb totale)



Merci pour votre attention