Archive of SID

بررسی ملکولی جهش‌های حذفی ژن آلفا گلوبین در بیماران با کم‌خونی هیپوکرومی میکروسیتی در کرمانشاه*

رضا علی‌بخشی[1]*؛ مجید آرش[2]؛ رضا اکرمی‌پور[3]؛ حمید نعمانی[1]؛ محمدرضا فرشچی[4]؛ سهیلا فتح‌الهی[4]؛ منصور رضایی[5]

چکیده

زمینه: اکثر جهش‌های آلفاتالاسمی شامل حذف یک یا هر دو ژن آلفا گلوبین هستند. از آن‌جا که جمعیت ایران ترکیبی از گروه‌های قومی مختلف است، توزیع و فراوانی جهش‌های ژن آلفا گلوبین در نواحی متفاوت نیاز به بررسی دارد. این مطالعه به‌منظور شناسایی حذف‌های شایع ژن آلفا گلوبین در میان افراد با کم‌خونی هیپوکرومی میکروسیتی در استان کرمانشاه انجام شده است.

روش‌ها: پس از ارزیابی اولیه، 92 بیمار شامل 47زن و 45مرد با کم‌خونی هیپوکرومی میکرسیتی(MCV<80 fl & MCH<27pg) جهت انجام این مطالعه انتخاب شدند. تمامی نمونه‌ها برای تشخیص چهار حذف ژن آلفاگلوبین شامل $-\alpha^{3.7}$، $-\alpha^{4.2}$ ، $-(\alpha)^{20.5}$ و $--^{MED}$ با استفاده از تکنیک GAP-PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. پس از تکثیر، 10 میکرولیتر از محصول بر روی ژل آگارز 1/2 درصد الکتروفورز شد. باندها در محلول اتیدیوم بروماید نمایان و در زیر دستگاه ترانس ایلومیناتور عکس‌برداری به‌عمل آمد.

یافته‌ها: 45 بیمار واجد حذف $-\alpha^{3.7}$ بودند. در بیماران دارای حذف $-\alpha^{3.7}$ هم در حالت هتروزیگوت و هم در حالت هموزیگوت، مقدار MCH کم‌تر از محدوده طبیعی و میزان هموگلوبین A2 در محدوده طبیعی بود. سایر جهش‌های حذفی شایع شامل $-(\alpha)^{20.5}$ ، $-\alpha^{4.2}$ و$--^{MED}$ مشاهده نشدند.

نتیجه‌گیری: فراوانی حذف $-\alpha^{3.7}$ (تنها جهش یافت شده حذفی) در بیماران با کم‌خونی هیپوکرومی میکروسیتی در کرمانشاه 48/9 درصد بود.

کلیدواژه‌ها: آلفا تالاسمی، جهش‌های حذفی، تکنیک GAP PCR، کم‌خونی هیپوکرومی میکروسیتی

«دریافت: 1388/10/19 پذیرش: 1389/3/18»

1. گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

2. کمیته تحقیقات دانشجویان، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

3. گروه کودکان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

4. آزمایشگاه ژنتیک پزشکی، آزمایشگاه مرکزی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

5. گروه آمار زیستی، دانشکده پزشکی و عضو مرکز تحقیقات سلامت دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

***عهده‌دار مکاتبات:** کرمانشاه، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی، تلفن: 0831-7213330

Email: ralibakhshi@kums.ac.ir

* **این مقاله برگرفته از پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد آقای مجید آرش در دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه می‌باشد.**

مقدمه

آلفاتالاسمی نوعی بیماری ژنتیکی با توارث اتوزومی مغلوب، همراه با کاهش یا عدم ساخت زنجیره‌های پلی‌پپتیدی آلفاگلوبین هموگلوبین است. زنجیره‌های آلفاگلوبین به‌صورت زیرواحدهای هموگلوبین جنینی (HbF:α2γ2) و هموگلوبین بزرگسالان (HbA:α2β2) عمل می‌کنند. برعکس بتاتالاسمی که در ایجاد آن جهش‌های غیرحذفی غالب هستند، اکثر انواع آلفاتالاسمی

www.SID.ir

Archive of SID

شناخته‌شده دارای حذف یک یا دو ژن آلفاگلوبین بر روی کروموزوم 16p13.3 هستند **(1 و 2)**. آلفاتالاسمی به‌عنوان یکی از شایع‌ترین نقص‌های ژنتیکی در سرتاسر دنیا شناخته می‌شود. این بیماری با فراوانی بالایی در منطقه وسیعی که از حوزه مدیترانه تا سرتاسر خاور میانه، شبه قاره هند، برمه و آسیای جنوب شرقی کشیده شده است، دیده می‌شود. بالاترین شیوع بیماری آلفا تالاسمی، در آسیای جنوبی و در میان جوامعی که منشأ آن‌ها از سواحل غرب آفریقا است مشاهده می‌شود. این بیماری در تایلند با شیوع **4/8-10** درصد گزارش شده است **(3)**. همچنین این بیماری در آسیای جنوب شرقی **(4 و 5)**، چین **(6 و 7)** و به‌طور پراکنده در هند **(8 و 9)**، کویت **(10)**، یونان، ایتالیا **(13-11)** و اروپای شمالی **(14)** دیده می‌شود. جهش‌های حذفی و غیرحذفی موجب ایجاد آلفاتالاسمی می‌شوند. بسیاری از جهش‌های غیرحذفی ژن آلفاگلوبین حاصل جایگزینی‌های نوکلئوتیدی هستند. شایع‌ترین جهش‌های حذفی، حذف‌های تک‌ژنی $-\alpha^{3.7}$ و $-\alpha^{4.2}$ در آسیا، حذف‌های دوژنی $--^{SEA}$ و $--^{FIL}$ در آسیای جنوب شرقی و حذف‌های دوژنی $-(\alpha)^{20.5}$ و $--^{MED}$ در نواحی مدیترانه‌ای است. حذف $--^{THAI}$ در تایوان شیوع بالایی‌دارد **(15 و 16)**. حذف تکی **(-α)** یا دوتایی **(--/αα)** از ژن‌های α-گلوبین در حالت سیس از رایج‌ترین علل تالاسمی است. در حدود **25** نوع حذف دوژنی سیس مختلف **(--/αα)** و هشت حذف تک‌ژنی **(-α)** در جمعیت‌های مختلف گزارش شده است **(17)**. مطالعه حاضر با هدف بررسی ملکولی جهش‌های حذفی ژن آلفاگلوبین در بیماران با کم‌خونی هیپوکرومی میکروسیتی در کرمانشاه در سال **88-1387** انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری از بین بیماران مراجعه‌کننده به آزمایشگاه مرکزی کرمانشاه **(ارجاعی از طرف پزشک متخصص)** صورت گرفت. این افراد دارای آنمی هیپوکروم میکروسیتیک همراه با MCV و MCH پائین (MCV<80 fl; MCH<27 pg) و HbA2 نرمال یا کاهش‌یافته (HbA2<3.5%) بودند. به‌علاوه این افراد تحت درمان آهن قرارگرفته و پس از این‌که به درمان پاسخ ندادند به‌منظور جستجوی جهش‌های ژن آلفا مورد مطالعه قرارگرفتند. تعداد افراد مورد بررسی **92** نفر بودند **(47** زن و**45** مرد**)** و محدوده سنی آن‌ها بین **41-17** سال بود. مقادیر شاخصه‌های خونی تمامی نمونه‌ها به‌وسیله سیستم SYSMEX KX-21 در آزمایشگاه مرکزی کرمانشاه اندازه‌گیری شد. همچنین الکتروفورز هموگلوبین A2 در این آزمایشگاه انجام گرفته و برای اطمینان از صحت آن، میزان هموگلوبین A2 با استفاده از کروماتوگرافی ستونی نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس تخلیص DNA نمونه‌ها به‌وسیله تکنیک salting out و با استفاده آنزیم پروتئیناز K انجام گرفت. غلظت DNA نمونه‌ها با استفاده از سیستم nanodrop spectrophotometer ND-1000 اندازه‌گیری شد.

تکنیک Gap PCR برای تشخیص جهش‌های حذفی مورد استفاده قرار می‌گیرد و پرایمرهای مورد استفاده در این تکنیک، طوری طراحی شده که دو طرف محل حذف‌شده را در بر گیرد **(18)**. بر اساس غلظت DNA، مقدار مناسب نمونه در تیوب‌های واکنش ریخته شد. برای تعیین هر یک از جهش‌های حذفی، ابتدا به ازای هر نمونه، **50** میکرولیتر PCR MIX، شامل **2**mM MgCl2، **0/2**mM dNTP و GC-Rich solution(5X) و آب مقطر دیونیزه استریل، در یک تیوب بزرگ ریخته شد. مقادیر مختلف پرایمرهای Forward و Reverse $-\alpha^{3.7}$ و $-(\alpha)^{20.5}$، پرایمرهای Forward و Reverse $-\alpha^{4.2}$ و پرایمرهای Forward و Reverse $--^{MED}$ بسته به نوع حذف مورد بررسی در تیوب ریخته شدند. سپس به‌ازای هر نمونه، **2/5**Unit آنزیم به تیوب افزوده شد. پس از مخلوط کردن محتویات تیوب بزرگ، به هر تیوب واکنش حاوی DNA، **50** میکرولیتر از مخلوط مذکور اضافه گردید. به‌دنبال بهینه‌سازی شرایط Gap PCR برای مقادیر پرایمرها، دما، غلظت کلراید منیزیم و مقدار آنزیم، تیوب‌های واکنش در

www.SID.ir

Archive of SID

ترموسایکلر (Biometra,Germany) قرار داده شد و بهترین شرایط برای انجام مراحل مختلف Gap PCR به‌صورت ذیل به‌دست آمد، چرخه اول به‌مدت **5** دقیقه در دمای **95** درجه سانتی‌گراد و به‌دنبال آن **35** چرخه به‌صورت دمای دناتوره شدن در دمای **95** درجه سانتی‌گراد به‌مدت **45** ثانیه، دمای اتصال **61** درجه سانتی‌گراد به‌مدت **1** دقیقه و دمای گسترش **72** درجه سانتی‌گراد به‌مدت **2** دقیقه و **30** ثانیه تعیین گردید. در پایان این مراحل به‌مدت **5** دقیقه دمای **72** درجه سانتی‌گراد به دستگاه داده شد. پس از تکثیر قطعات مورد نظر، محصولات PCR بر روی ژل آگارز **1/2** درصد با ولتاژ **85** ولت و به‌مدت **1** ساعت Run شدند. پس از گذشت این زمان، ژل در دستگاه ترانس لومیناتور قرار داده شد و باندهای تکثیرشده مشاهده شدند.

یافته‌ها

در این مطالعه چهار جهش حذفی شایع شامل جهش‌های حذفی $-\alpha^{4.2}$، $-(\alpha)^{20.5}$، MED -- و $-\alpha^{3.7}$ بر روی بیماران مبتلا به کم‌خونی هیپوکروم میکروسیتیک در استان کرمانشاه مورد بررسی قرار گرفتند. از میان **92** بیمار تحت مطالعه، **45** بیمار **(48/9%)** دارای حذف از نوع تک‌ژنی $-\alpha^{3.7}$ بودند. از میان **45** بیماری که حذف $-\alpha^{3.7}$ در آن‌ها مشاهده شد، **40** بیمار **(88/9%)** دارای حذف به‌صورت هتروزیگوت **(–α/αα)** و **5** بیمار **(11/1%)** دارای حذف به‌صورت هموزیگوت **(-α/-α)** بودند. در تعدادی از نمونه‌ها که حذف $-\alpha^{3.7}$ به‌صورت هتروزیگوت بود، مقادیر MCV و MCH در محدوده نزدیک به طبیعی قرار داشتند. همچنین در هیچ‌یک از نمونه‌های مورد مطالعه، جهش‌های حذفی $-\alpha^{4.2}$، $-\alpha^{20.5}$ و MED -- یافت نشد.

برای تکثیر نمونه‌های مورد بررسی، در هر بار که PCR انجام شد، نمونه کنترل مثبت مربوط به آن حذف هم مورد استفاده قرار گرفته و تکثیرانجام شده است. این کار برای حصول اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر انجام گردید. پس از انجام Gap PCR بر روی نمونه‌ها به‌دلیل بزرگی اندازه قطعات، محصولات تکثیرشده بر روی ژل آگارز **1/2** حرکت داده شدند.

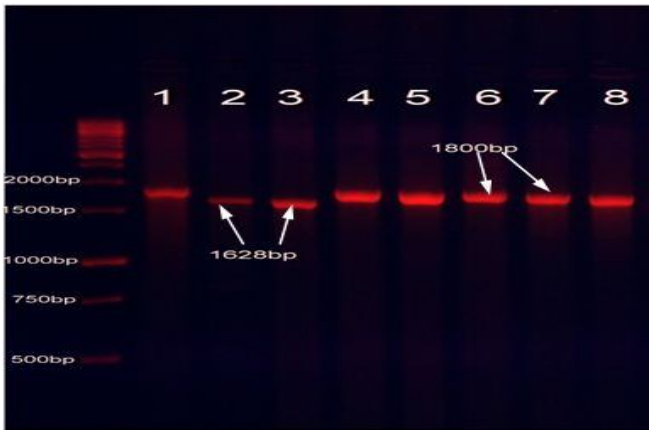
جهش حذفی $-\alpha^{3.7}$ بر روی خوشه آلفاگلوبین، این حذف در **45** بیمار مشاهده شد. باندهای مربوط به حذف $-\alpha^{3.7}$ دارای طول **2029** جفت باز و باندهای مربوط به قطعه α2 دارای طول **1800** جفت بازی هستند **(تصویر 1)**. در بررسی جهش حذفی $-\alpha^{4.2}$ بر روی خوشه آلفاگلوبین، هیچ موردی با این حذف در میان نمونه‌های مورد بررسی مشاهده نشد. باندهای مربوط به حذف $-\alpha^{4.2}$ دارای طول **1628** جفت باز بوده و باندهای مربوط به قطعه α2 دارای طول **1800** جفت باز هستند **(تصویر 2)**. همچنین جهش حذفی $-(\alpha)^{20.5}$ بر روی خوشه آلفاگلوبین در نمونه‌های مورد بررسی یافت نشد. باندهای مربوط به حذف $-(\alpha)^{20.5}$ دارای طول bp **1007** بوده و باندهای مربوط به قطعه α2 دارای طول bp **1800** هستند

تصویر 1- lane3 مربوط به حذف $-\alpha^{3.7}$ به‌صورت هموزیگوت و lane 2 مربوط به همین حذف به‌صورت هتروزیگوت است، lane1 نیز مربوط به نمونه فاقد این حذف می‌باشد. باند با طول bp **2029** مربوط به باند $-\alpha^{3.7}$ و باندهای با طول bp **1800** مربوط به باند α2 هستند.

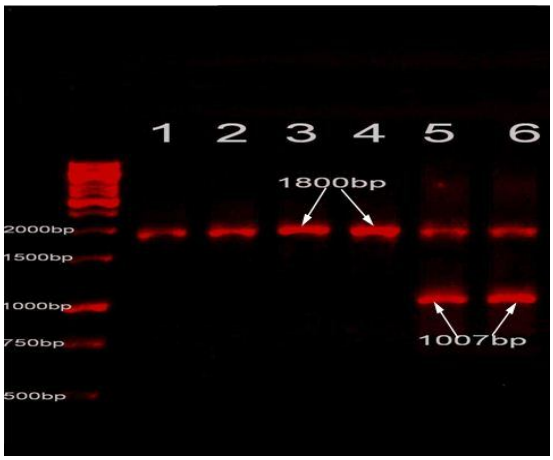
www.SID.ir

Archive of SID

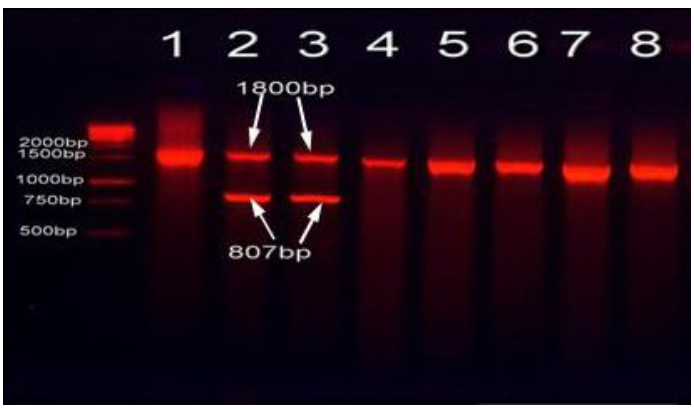
(تصویر 3). هیچ بیماری با جهش حذفی ^{MED}-- بر روی خوشه آلفاگلوبین یافت نشد. باندهای مربوط به حذف ^{MED}-- دارای طول bp 807 بوده و باندهای مربوط به قطعه α2 دارای طول bp 1800 هستند (تصویر 4).



تصویر 2- lane **2** و **3** مربوط به حذف $^{4.2}\alpha$- به‌صورت هموزیگوت و lane **1**، **4**، **5**، **6**، **7** و **8** مربوط به نمونه‌های فاقد این حذف بوده که دارای باند با طول bp **1800** مربوط به α2 هستند



تصویر3- lane **5** و**6** مربوط به حذف $^{20.5}(\alpha)$- به‌صورت هتروزیگوت هستند که دارای باندهای با طول bp**1007** بوده و lane **1**، **2**، **3** و **4** مربوط به نمونه‌های فاقد این حذف می‌باشند که دارای باندهای با طول bp **1800** مربوط به باند α2 هستند.



تصویر 4- باندهای مشاهده‌شده در lane **1**، **4**، **5**، **6**، **7** و **8** باند α2 با طول bp **1800**هستند. درlane **2** و **3** باند ^{MED}-- با طول bp 807 مشاهده می‌شوند که مربوط به نمونه‌های هتروزیگوت برای این حذف می‌باشند.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

نتایج بررسی چهار حذف شایع بر روی خوشه آلفاگلوبین نشان دادند که در بین افراد مورد مطالعه در استان کرمانشاه، تنها حذف تکی $-\alpha^{3.7}$ شناسایی گردید. در صورتی‌که نمونه‌های بیشتری مورد بررسی قرار گیرند، ممکن است جهش‌های حذفی دیگری وجود داشته باشد و در این حالت، درصد جزیی از جهش‌های حذفی را به خود اختصاص دهند. بنابراین نتایج این تحقیق، دلیلی بر رد سایر جهش‌های حذفی در استان کرمانشاه نیست. شایان ذکر است در صورت بررسی جهش‌های نقطه‌ای و سایر جهش‌ها، درصد جهش‌های یافت‌شده در افراد مورد مطالعه و استان افزایش خواهد یافت. از 92 فرد مورد مطالعه، 45 فرد (48/9%) دارای این نوع جهش حذفی بودند؛ 40 مورد (43/5%) به‌صورت هتروزیگوت ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) برای حذف $-\alpha^{3.7}$ و 5 نفر (5/4%) به‌صورت هموزیگوت ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$) برای این حذف بودند.

نیشابوری و همکاران در سال 2001 تعداد 57 فرد ایرانی با آنمی هیپوکروم میکروسیتیک را مورد بررسی قرار دادند و در جهش‌های حذفی ژن آلفاگلوبین مورد مطالعه تنها جهش حذفی $-\alpha^{3.7}$ (31/6%) را شناسایی نمودند (19).

کیانی شیرازی و همکاران، در سال 2006 تعداد هفت جهش ژنی از نوع حذف را بر روی 114 بیمار مشکوک به آلفاتالاسمی مورد بررسی قرار دادند (نمونه‌ها مربوط به استان‌های مختلف کشور بوده است). از این تعداد 29 مورد برای $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ هتروزیگوت و 18 مورد هموزیگوت $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ بودند. همچنین 2 مورد، هردو حذف 3/7 و 4/2 را داشتند ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$) و 12 مورد هتروزیگوت $-\alpha^{4.2}/\alpha\ \alpha$، 5 مورد هتروزیگوت MED/α α-- و 8 مورد هتروزیگوت $-\alpha^{20.5}/\alpha\alpha$ بودند و 40 مورد هم شاخصه‌های هماتولوژیکی پائینی داشته ولی هیچ حذفی را نشان ندادند (20).

EL-kalla و Baysal در سال 1998 ژن‌های آلفاگلوبین را در 418 نمونه خون بند ناف نوزادان اماراتی آنالیز کرده و دو نوع جهش حذفی را در افراد مورد مطالعه گزارش نمودند. فراوان‌ترین جهش در بین نمونه‌های مورد مطالعه، جهش حذفی $-\alpha^{3.7}$ بوده (68%) و فقط در یک مورد هم جهش‌های حذفی $-\alpha^{3.7}$ و $-\alpha^{4.2}$ به‌صورت هتروزیگوت مرکب $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$ بودند (21).

Borges و همکاران در سال 2001 توزیع انواع حذف‌های آلفاتالاسمی را در 339 فرد بالغ برزیلی (98 نفر سیاه پوست و 241 نفر سفید پوست) که MCH و MCV کاهش‌یافته و هموگلوبین طبیعی داشتند، مورد بررسی قرار دادند. از این تعداد، 169 نفر آلفاتالاسمی بودند. در بین آن‌ها 145 نفر (42/8%) برای حذف alpha3.7– به‌صورت هتروزیگوت و 18 نفر (5/3%) به‌صورت هموزیگوت بودند. همچنین 5 نفر (1/5%) به‌صورت هتروزیگوت برای فرم غیرحذفی و یک نفر (3/%) حامل حذف مدیترانه‌ای بود (22).

Adekile و همکارانش در سال 1994، بیماری آلفاتالاسمی را در بین عرب‌های کویتی مورد بررسی قرار دادند. در این بررسی ژن‌های آلفاگلوبین در 64 کروموزوم با استفاده از تکنیک‌های ژنتیک ملکولی آنالیز شدند. در این پژوهش، 3 نوع جهش در 30 کروموزوم در بین افراد با بیماری HbH شناسایی شدند. در بین آن‌ها جهش حذفی $-\alpha^{3.7}$، 10 درصد موارد را به خود اختصاص داد (23).

Win و همکارانش در سال 2006 سه حذف شایع $-\alpha^{3.7}$، $-\alpha^{4.2}$ و $--^{MED}$ منطقه جنوب شرق آسیا را در 170 بیمار تالاسمی میانماری بررسی کرده ودر 27 بیمار، جهش حذفی را شناسایی کردند (24).

مقایسه نتایج حاصل از بررسی حاضر با سایر تحقیق‌هایی که در بسیاری از نقاط دیگر انجام شده نشان می‌دهد که میان نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج سایر تحقیق‌ها تطابق خطی وجود دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان دادند که حذف $-\alpha^{3.7}$، شایع‌ترین حذف در بیماران مبتلا به آنمی هیپوکروم میکروسیتیک در استان

www.SID.ir

Archive of SID

کرمانشاه است. پیشنهاد می‌شود که برای شناسایی انواع مختلف آلفاتالاسمی، علاوه بر جهش‌های حذفی، ارزیابی جهش‌های غیرحذفی (جهش‌های نقطه‌ای و..) در بیماران مشکوک به آلفاتالاسمی صورت پذیرد.

References

1. Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AO, Pretorius IM, Jaman AP, Weatherall DJ. A review of the molecular enetics of the human alpha-globin gene cluster. Blood. 1989; 73(5): 1081-104.
2. Kazazian HH Jr. The thalassemia syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. Semin Hematol 1990; 27(3): 209-28.
3. Flatz G. Hemoglobinopathies in Thailand. Br J Hematol 1965; 11: 216-27.
4. Lopez CG, Lei-Injo LE. Alpha and beta thalassemia in newborns in west Malaysia. Hum Hered 1971; 21:185-91.
5. Pet Al. Alpha and beta thalassemia in Thailand. Ann NY Acad Sci 1969; 165: 60-82.
6. Chen FE, Ooi C, Ha SY, Cheung BM, Todd D, Liang R, et al. Genetic and clinical features of hemoglobin H disease in Chinese patients.N Engl J Med 2000; 343(8): 544–50.
7. Chang JG, Lee LS, Lin CP, Chen PH, Chen CP. Rapid diagnosis of a-thalassemia-I of Southeast Asia type and hydrops fetalis by polymerase chain reaction. Blood 1991; 78(3): 853-4.
8. Rudra T, Chakrabarti S, Sengupta B. Alpha thalassaemia: experience of referral cases in Kolkata, India. Int J Hum Genet 2008; 8(4): 357-60.
9. Kulozik AE, Kar BC, Serjeant GR, Serjeant BE, Weatherall DJ. The molecular basis of alpha thalassemia in India. Its interaction with the sickle cell gene. Blood 1988: 71(2): 467-72.
10. Adekile AD, Gu LH, Baysal E, Haider MZ, al-Fuzae L, Aboobacker KC, et al. Molecular characterization of alpha-thalassemia determinants, beta-thalassemia alleles and beta S haplotypes among Kuwaiti Arabs. Acta Haematol 1994; 92(4): 176-81.
11. Nicholas RD. Thalassemia due to recombination between the α1 globin gene and an alu I repeat. Blood 1985; 65: 1434-8.
12. Di Rienzo A, Novelletto A, Aliqu? MC, Bianco I, Tagarelli A, Brancati C. Molecular basis for HbH disease in Italy: geographical distribution of deletional and nondeletional alpha-thalassemia haplotypes. Am J Hum Genet 1986; 39(5): 631–9.
13. Dittman WA, Haut A, Wintrobe MM, Cartwright GE. Hemoglobin associated with an uncommon variant of thalassemia trait. Blood 1960; 15: 975-83.
14. Hedenberg F, Muller-Eberhard U, Sjolin S, Wranne L. Hemoglobin H and inclusion body anemia in a Swedish family. Acta Paediatr 1958; 47(6): 652-65.
15. Ko TM, Chen TA, Hsieh MI, Tseng LH, Hsieh FJ, Chuang SM, et al. Alpha-thalassemia in the four major aboriginal groups in Taiwan. Hum Genet 1993; 92(1): 79-80.
16. Ko TM, Tseng LH, Kao CH, Lin YW, Hwa HL, Hsu PM, et al. Molecular characterization and PCR diagnosis of Thailand deletion of α-globin gene cluster. Am J Hematol 1998; 57(2): 124-30.
17. Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, Cutting GR. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of α-thalassemia; Blood 2000; 95(1): 360-4.
18. Pearson HA, O'Brien RT, McIntosh S.Screening for thalassemia trait by electronic measurement of mean corpuscular volume. N Engl J Med 1973; 288(7): 351-3.
19. Neishabury ML, Abbasi-Moheb L, Najmabadi H. Alpha-thalassemia deletion analysis in Iran. Arch Iran Med 2001; 4(4): 160-4.
20. Kiani-Shirazi R, Zeinali S, Karimipoor M, Zarbakhsh B, Alibakhshi R. [PCR application in recognition of prevalent deletion of α globin gene in alpha thalasemia carriers (Persian)]. Tehran University Medical Journal 2006; 64(2): 95-9.
21. El-Kalla S, Baysal E. Alpha-thalassemia in the United Arab Emirates. Acta Haematol 1998; 100(1): 49-53.
22. Borges E, Wenning MR, Kimura EM, Gerv?sio SA, Sonati MF,Costa FF. High prevalence of alpha-thalassemia among individuals with microcytosis and hypochromia without anemia. Braz J Med Biol Res 2001; 34(6):759-62.
23. Adekile AD, Gu LH, Baysal E, Haider MZ, al-Fuzae L, Aboobacker KC, et al. Molecular characterization of alpha-thalassemia determinants, beta-thalassemia alleles and beta S haplotypes among Kuwaiti Arabs. Acta Haematol 1994; 92(4): 176-81.
24. Ne-Win, Harano K, Harano T, Thein-Thein-Myint, Rai-Mra, Aye-Aye-Myint, et al. Common alpha-thalassemia deletions in transfusion-dependent thalassemia patients in the Southeast Asia region of Myanmar. Lab Hematol. 2006; 12(3): 139-42.

www.SID.ir