



Редки Болести и Лекарства Сираци

Брой 1 / 2023 г.

ISSN 1314-3581
<http://journal.raredis.org>

Интерпретацията на лабораторни резултати – ключов фактор за превенция на тежки хемоглобинопатии

Мирела Рангелова¹, Зоя Петкова²

¹ Трето отделение по Клинична хематология, Специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания, София
² Лаборатория по Медицинска генетика, направление „Таласемии и патологични хемоглобини“, Специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания, София

Резюме

Хемоглобинопатиите са уникални сред всички генетични заболявания, защото в повечето случаи практически здравите носители могат да се идентифицират чрез общодостъпни кръвни тестове – кръвна картина, осмотична резистентност, типове хемоглобин (първа група тестове) и да не се налага молекулярен анализ. При наличието на аномални хемоглобинови фракции се прилагат функционални изследвания, чрез които с голяма степен на достоверност се определя видът на патологичния хемоглобин и неговото клинично значение, без да се използват скъпоструващи молекулярни методи. Потвърждаването на наличието на генни мутации с молекулярни техники е необходимо само в малък процент от случаите – при т.нар. „рискови двойки“ с цел профилактика на таласемия майор, за пренатална или преимплантационна диагностика – когато и двамата родители са суспектни или с доказано носителство на таласемия, или клинично значим патологичен хемоглобин.

Чрез съпоставка и интерпретация на резултати от подходящи кръвни изследвания, анамнеза на пациента и вземане предвид на допълнителни фактори, правилната диагностика на хемоглобинопатиите с немоллекулярни методи е от решаващо значение за предотвратяване на раждането на деца с тежката диагноза.

Молекулярни изследвания за определяне вида на мутацията – ДНК или протеинов анализ (тестове от втора група), не са предмет на настоящата публикация.

Ключови думи: таласемия, хемоглобинопатия, капилярна електрофореза, хемоглобин А2, хемоглобин F

The interpretation of laboratory results – a key factor in the prevention of severe hemoglobinopathies

Mirela Rangelova¹, Zoya Petkova²

¹ Third Department of Clinical Hematology, Specialized Hospital for Active Treatment of Hematological Diseases, Sofia
² Laboratory of Medical Genetics, “Thalassemias and Pathological Hemoglobins” Sector, Specialized Hospital for Active Treatment of Hematological Diseases, Sofia

Abstract

Hemoglobinopathies are unique amongst all genetic diseases because the identification of healthy carriers is possible by commonly available blood tests – blood count, osmotic fragility, hemoglobin profile (first line tests) and molecular analysis is not required. If any abnormal hemoglobin fraction appears, functional tests are applied to determine with a pretty good degree of reliability the type of pathological hemoglobin and its clinical significance, avoiding the usage of expensive molecular methods. Confirmation of gene mutations presence with molecular techniques is only necessary in small number of cases - in so-called “couples at risk” for the purpose of prevention of thalassemia major, for prenatal or pre-implantation diagnosis - when both parents are thalassemia carriers (or suspected carriers), or carriers of clinically significant hemoglobin variant.

By comparison and evaluation of the results of relevant blood tests, the patient’s history, and considering additional factors, the proper diagnosis of hemoglobinopathies with non-molecular methods is crucial for the prevention of a childbirth with a severe diagnosis.

Molecular studies to determine the type of mutation—DNA or protein analysis (second-line tests)—are not the subject of this publication.

Keywords: thalassemia, hemoglobinopathy, capillary electrophoresis, hemoglobin A2, hemoglobin F

Кореспонденция:

Зоя Петкова
e-mail: toteva_z@abv.bg

Correspondence:

Ms. Zoya Petkova
e-mail: toteva_z@abv.bg

Въведение

Нарушенията в хемоглобиновата синтеза, които се изразяват в количествени и качествени промени в структурата на хемоглобиновата молекула, са най-често срещаните наследствено предавани по аутозомно-рецесивен начин заболявания. Това е хетерогенна група от различни състояния, които се категоризират в две главни групи: таласемии и хемоглобинови варианти, наричани патологични или аномални хемоглобини. В унаследяването участват гените и на двамата родители, като полът на детето е без значение.

При таласемии има количествени нарушения в синтеза на хемоглобин. Дължат се на генетични дефекти – мутации, вследствие на които синтезът на съответната глобинова верига е намален или напълно липсва. Разделят се на α -, β - или δ -, в зависимост от това кой вид глобинова верига е засегната.

Наличието на аномални (патологични) хемоглобини се дължи на качествени нарушения – структурни аномалии, водещи до промяна в заряда и функциите на хемоглобиновата молекула. Познати са над 1000 хемоглобинови варианти, дължащи се на единична или двойна субституция на аминокиселини в α -, β -, γ - или δ -веригата, делеция, вмъкване, хибридизация или прекръстосване. Примери за това са HbS, HbD, HbO-Arabia, Hb Lepore и много други [1].

Носителството на β -таласемия в лека (хетерозиготна) форма не оказва влияние върху здравето, продължителността и качеството на живота, дори и да е съпътствано с лека анемия в някои случаи. Съществува обаче 25% вероятност да се роди дете с таласемия майор, ако и двамата биологични родители са с лека таласемия [2]. В България са регистрирани приблизително 290 пациента с тежка форма на таласемия, а годишно у нас се раждат между 2 и 6 такива деца. Около 2,5% от населението са носители на таласемичен ген, а в определени райони процентът на носителство е дори по-голям [3].

Единствен начин за осъществяване на превенция е изследването на биологичните родители за носителство на хемоглобинопатия и навременна пренатална диагностика. Проблемът е, че голяма част от тях дори не подозират за това, защото са практически здрави хора, а най-голямото предизвикателство в първоначалната диагностика на хемоглобинопатиите са т.нар. silent (тихи) форми, при които мутацията съществува, но липсват лабораторни манифестации. Необходими са познания и богат лабораторен опит, за да се прецени нуждата от провеждането на допълнителни тестове за дефинитивно доказване.

Всички пропуски в диагностиката могат да доведат до нежелани последствия. Ето защо за ограничаване разпространението на хемоглобинопатиите, усилията

трябва да се насочат към правилна и сигурна лабораторна диагностика.

Материал и методи

Освен при проявени симптоми като анемичен синдром, хепатомегалия, спленомегалия, субиктер, иктер, коремни болки, хемолитични кризи, провокирани от фебрилитет, цианоза, за изследване трябва да се насочват и здрави хора в случаи на открита микроцитоза и хипохромия при профилактични изследвания, членове на семейство, кръвни роднини във фертилна възраст и партньори на хора с установена таласемия или патологичен хемоглобин.

Оптимален вариант с превантивна за поколението цел е изследване преди забременяване на планиращи бременност двойки, включително *in vitro*, партньора на вече доказан носител, както и задължително донорите на биологичен материал за *in vitro* процедури.

Изследването след забременяване трябва да се извърши до 6 г. с. от началото на бременността, а при положителен резултат – изследване на биологичния баща до 10 г. с., за да може евентуалната пренатална диагностика да се проведе до 17 г. с. [4].

Молекулярните изследвания за точно определяне на вида на мутацията са наложителни за предоставяне на възможност за информиран избор от страна на родителите и за контролиране на риска от раждане на дете с тежка хемоглобинопатия [4-5]. Примери за такива ситуации са:

- единият от двойката родители е с доказана клинично значима хемоглобинопатия, другият е съмнителен;
- двамата родители са съмнителни, особено за носителство на алфа-таласемия;
- необходимост от пренатална диагностика, ако двамата родители са с доказано носителство или майката е с доказано носителство, биологичният баща е неизвестен или отказва изследване.

Диагностицирането на хемоглобинопатиите с немоллекулярни методи е комплексен процес, изискващ познания, опит и отговорност от страна на лабораторния персонал и лекуващия лекар, и се състои в съпоставка и правилна интерпретация на резултатите от кръвни изследвания, анамнеза и допълнителни фактори, които имат отношение към диагностиката [4, 6-8].

Необходимите кръвни изследвания, които задължително трябва да се вземат под внимание, са:

- хемоглобинов профил – разделяне на хемоглобина на фракции (HbA, HbA₂, HbF и патологични хемоглобини) и определяне на количеството им в проценти;
- при наличие на патологичен хемоглобин – определяне на свойствата му (подвижност, стабилност, разтворимост, склонност към образуване на вътрееритроцит-

ни включвания и др.);

- пълна кръвна картина и морфология на еритроцитите;
- железен статус.

При определени обстоятелства биха били полезни и стойности на билирубин, витамин В12 и фолиева киселина.

Съществуват важни фактори, които влияят върху съотношението на хемоглобиновите типове [9-10]. Без информация за тях, всеки коментар относно хемоглобиновия профил би бил непълен или неточен.

Възрастта на пациента е от ключово значение, защото синтезът на феталния хемоглобин (HbF) намалява след раждане и достига нивото на възрастен човек между 6-месечна и 2-годишна възраст. Ето защо хемоглобиновият профил при деца под 1 година няма диагностична стойност.

При изразен анемичен синдром и хемолитични кризи реалното количество на HbA2 и минорните хемоглобинови фракции може да е намалено.

Наличието на придружаващи заболявания също влияе върху количеството на хемоглобиновите фракции – увеличен фетален хемоглобин може да се наблюдава при неопроцеси и ненаследствени хематологични заболявания, увеличен HbA2 при тиреотоксикоза, В12 и фолатен дефицит, намален HbA2 при железен дефицит и други.

Обратимо повишаване на фетален хемоглобин често се среща и при бременни жени.

Приемът на някои медикаменти, например противовирусни препарати, прилагани при ХИВ и сулфонамиди, може да доведе до увеличение на HbA2 и метхемоглобин съответно.

Важен фактор е и извършена хемотрансфузия, като хемоглобиновият профил е реален около 3 месеца след извършването ѝ, в зависимост от количеството и кратността на прелятата кръв.

Рециди особени обстоятелства също трябва да се имат предвид за превенция и преценка на генетичния риск. След евентуална костномозъчна трансплантация хемоглобиновият профил ще отразява донора и не би имал информативно значение. С изключително внимание трябва да се подхожда при *in vitro* процедури с донорски материал, както и в случаи на осиновяване при търсене на фамилна обремененост.

Информация за етническия произход на изследваното лице, особено във време на засилена миграция, също е много полезна при идентификация на хемоглобинопатиите [4, 7-8].

Резултатът от хемоглобиновия профил е от основно значение за диагностиката. Важно условие за изследването му е използването на лабораторни техники според изискванията на водещи институции в областта на клиничната и лабораторна хематология, като Международния консултативен съвет за стандартизация в хематологията (ICSH), Европейската мрежа за редки и вродени анемии

(ENERCA), Международната федерация по таласемия (TIF), Национална схема за външен качествен контрол на Великобритания (UK NEQAS-General Hematology – Abnormal Haemoglobins) [6, 8, 11-14].

За количествено определяне на хемоглобиновите фракции, изразено в проценти от тоталния хемоглобин, и определяне на свойства на аномални хемоглобини се препоръчват:

- капиларна електрофореза (CE);
- електрофореза с елуция;
- хроматография (HPLC);
- осмотична резистентност на еритроцитите в ед-на епруветка (STOFT);
- алкалноденатурационни тестове за фетален хемоглобин (мог. Singer и Betke);
- тестове за нестабилни хемоглобини – изопропилов и температурни;
- тестове за сърповидноклетъчна анемия – разтворимост (SST) и фалциформация;
- цитологични тестове за интраеритроцитни включвания (H- и Heinz-телца) и фетални еритроцити.

За количествено определяне на хемоглобинови фракции не са приемливи техники с оцветяване и последващо генцитометриране [13].

Резултати и обсъждане

Прег всички специалисти, които имат отношение към диагностиката и лечението на наследствените анемии, стои въпросът за профилактиката на тежките хемоглобинопатии. Тези случаи могат да се сведат до минимум, ако вниманието се насочи към избягване на най-често допусканите грешки. Освен лабораториите, отговорност за тях носят общопрактикуващите лекари, акушер-гинеколози, хематолози, педиатри, като ролята на самите пациенти и здравните институции също не бива да бъде подценявана. Причините за пропуските могат да бъдат обобщени по следния начин:

- недостатъчна информация;
- подценяване на проблема;
- липса на опит в интерпретацията на резултатите;
- липса на стандарт за диагностика на хемоглобинопатии в България.

Много често биологичните родители (включително и при *in vitro* процедури) изобщо не се изследват за хемоглобинов профил поради negliжиране на проблема, а едва след раждане на дете с таласемия майор се установява, че и двамата са носители на таласемичен ген.

В други случаи липсва фокус върху еритроцитните индекси при нормална стойност на хемоглобина, което води до пропускане на нетипични и „тихи“ форми на таласемия и носителство на аномален хемоглобин.

Практика е и предписване на железни препарати без данни за железен статус и хемоглибинов профил, при което се стига до излишно натоварване с желязо и пропускане на евентуална хемоглибинопатия.

Не са редки и случаи на пренебрегване на препоръка за генеалогичен анализ при фамилна обремененост – единият родител е доказан носител, другият не се изследва своевременно и резултатът е дете с таласемия майор, вина за което имат и пациенти, и лекари.

Случва се и изследването за хемоглибинопатия да се назначава на жени в напреднала бременност, когато, дори да има индикация, пренаталната диагностика е невъзможна.

Примери от лабораторната практика, илюстриращи най-честите грешки и пропуски:

1. Прилагане на неподходяща лабораторна техника за количествено определяне на хемоглибиновите фракции

При методи с оцветяване и денситометрия е възможно неточно определяне на HbA2 вследствие на визуализиране на нехемоглибинови фракции, недобро оцветяване или неправилна апликация на пробата. Всичко това води до промяна в изчислението на процентното съдържание на отделните видове хемоглобин [13, 15].

Прилагането на методи с недостатъчна разделителна способност прави резултатите трудни за интерпретация. При капилярна електрофореза визуалната картина е изчистена и количествата на фракциите се определят

точно. Минорните пикове и шумовете при базовата линия на графиката при хроматография могат да компрометират съотношенията между хемоглибиновите типове [16-19].

2. Подценяване на проблема, липса на информация и опит, пренебрегване на препоръки (случаи от нашата практика)

Ако не се изследва хемоглибинов профил при кръвна картина без изменения, атипични носители на таласемия и наличието на аномални хемоглобини могат да се пропуснат [4, 9-10, 20].

От таблица 1 се вижда, че при семейства А, В и С единият родител е носител на хетерозиготна β-таласемия, с типични кръвни показатели, нормален железен статус и повишено количество HbA2, а другият има напълно нормални хематологични показатели (дадени с курсив) и само утежнената клинична картина при детето е причина да се подозира хемоглибинопатия. Това беше установено след извършване на електрофорезата. В семейство С майката е доказан носител на β-таласемия. Бащата е с нормална КК. Изследван е за хемоглибинов профил след раждането на детето и се оказва безсимптомен носител на аномален хемоглобин, най-вероятно Hb O'Arabia. Детето е двоен хетерозигот, унаследило едновременно β-таласемия и Hb O'Arabia. Клиничната картина при подобни двоини хетерозиготи зависи от вида β-таласемия (β+ или β0).

Често при нормален хемоглибинов профил не се

Таблица 1. Хематологични резултати и хемоглибинов профил при пет семейства с деца с тежка хемоглибинопатия

	HGB [g/L]	MCV [f/L]	MCH [pg]	Fe [μmol/L]	Електрофореза [%]		
					HbA2	HbF	Аномален Hb
A. Баща Майка Дете (Тал. Майор)	135	68,2	21,4	19,8	5,3	2,1	
	118	85,7	28,1	13,4	4,3	0	
	67	77,8	25,0	24,5	2,7	72,7	
B. Баща Майка Дете(Тал.Интермедия)	160	83,1	27,0	19,1	4,4	0	
	116	61,6	19,1	19,1	5,3	1,7	
	103	62,7	19,8	20,0	6,9	18,9	
C. Баща Майка Дете Тал.Интермедия	180	85,0	30,1	17,1	42,0 (A2+X)	0	42,0 (A2+O'Arabia)
	126	57,7	18,0	12,2	5,7	0	
	101	60,0	20,0	16,1	67,7 (A2+X)	4,7	67,7 (A2+O'Arabia)
D. Баща Майка Дете Тал. Майор	144	70,8	22,0	16,8	3,1	0	
	126	71,4	22,2	16,1	4,6	0	
	67	53	17	18,3	7,4	21,2	
E. Баща (α-/αα или α-/α-) Майка (αα/- -) Дете (α-/- -) HbH болест	147	74,0	24,7	19,1	2,7	0	
	119	65,7	19,7	7,9	2,4	0	
	91	50,5	15,7		1,2	0,7	2,0 (Hb H) 1,0 (Hb Bart's)

Таблица 2. Изменение на HbA2 след компенсирание на желязния дефицит: HbA2=2.2% при изразен желязен дефицит. HbA2=2.8% при същия пациент след 3 месечен прием на желязо.

Пациент с ЖДА	Преди лечение	След лечение
HGB [g/L]	107,0	137,0
MCV [f/L]	76,3	88,9
MCH [pg]	23,0	29,1
Fe [μmol/L]	3,9	13,2
HbA2 [%]	2,2	2,8

обръща внимание на изменения в кръвната картина. Така се пропускат „тихите“ форми на таласемия. Пример за такава ситуация е семейство D. Бащата е с нормален хемоглибинов профил, но има понижени еритроцитни индекси без наличието на желязен дефицит, което е характерно за някои „тихи“ форми на β-таласемия. Майката е с типична хетерозиготна β-таласемия. Това е рискова двойка, която би трябвало да се насочи за ДНК анализ и пренатална диагностика.

Подобен проблем съществува и в семейство E. Родителите са с нормален хемоглибинов профил, но с понижени еритроцитни индекси при липса на желязен дефицит. Би могло да се допусне „тихо“ носителство на β-таласемия и при двамата, но хемоглибиновият профил на детето (патологични хемоглибинови фракции в зоните на HbH и Hb Bart's) потвърждава наличието на различни форми на α-таласемия при родителите. Рискова двойка.

3. Пренебрегване на съпътстващи заболявания

При желязен дефицит и анемичен синдром реалното количество на HbA2 може да се намали с около 0,5%, което

може да маскира носителство на бета-таласемия, особено при горногранични стойности на HbA2 [20-21] (Таблица 2).

При бременни с желязен дефицит се препоръчва незабавно изследване на партньора, без да се изчаква контролно изследване след нормализиране на желязния статус, тъй като при понижени еритроцитни индекси носителството на таласемия не може да бъде изключено дори и при нормална стойност на HbA2 [4, 21-22].

4. Неправилна интерпретация на хемоглибинов профил

В нашата практика сме срещали случаи, при които се наблюдава допълнителна минорна фракция около HbA2. Обикновено това са варианти на δ-таласемия (намален синтез на делта-веригите), които са безсимптомни и не представляват пряк генетичен риск, но трябва да се има предвид, че реалното количество на HbA2 е сума от двете фракции (Фигура 1) [23-25].

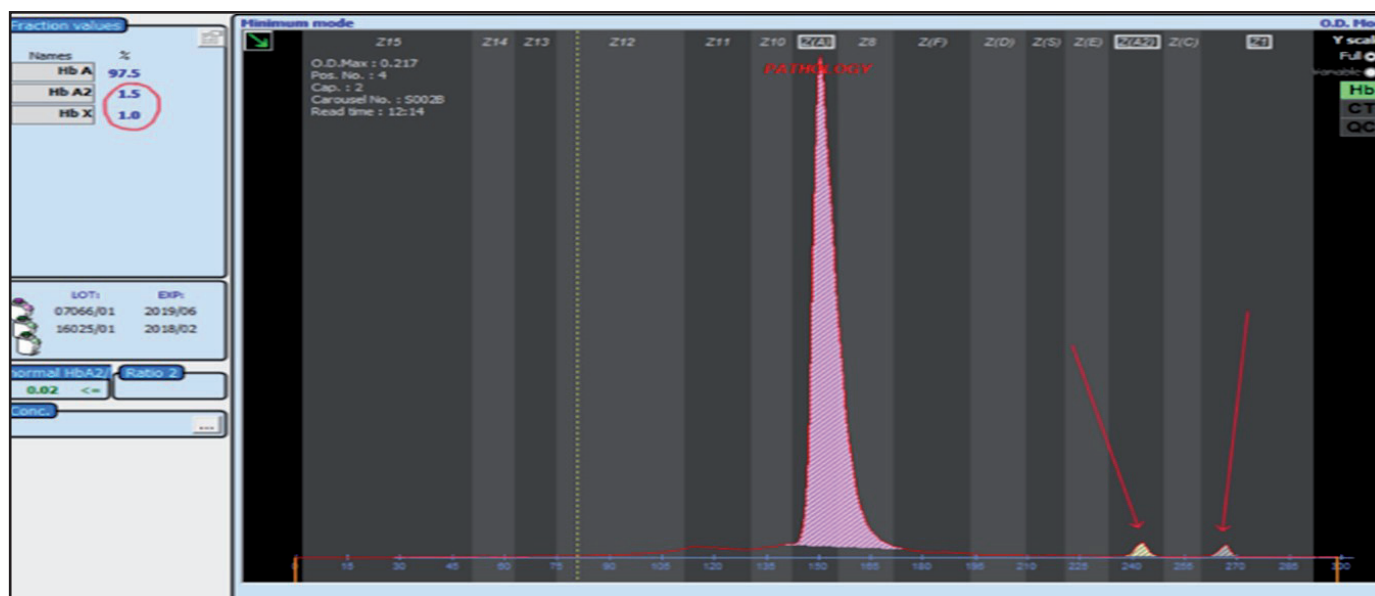
При едновременното унаследяване на β- и δ-таласемия (двойно хетерозиготно носителство), сумата от количеството на двете фракции надхвърля нормалната стойност за HbA2, което е индикация за носителство на таласемичен ген. Това се потвърждава и от кръвните показатели. Неглижирането на втория минорен пик може да доведе до пропуск в диагностицирането на таласемия (Фигура 2).

Изводи

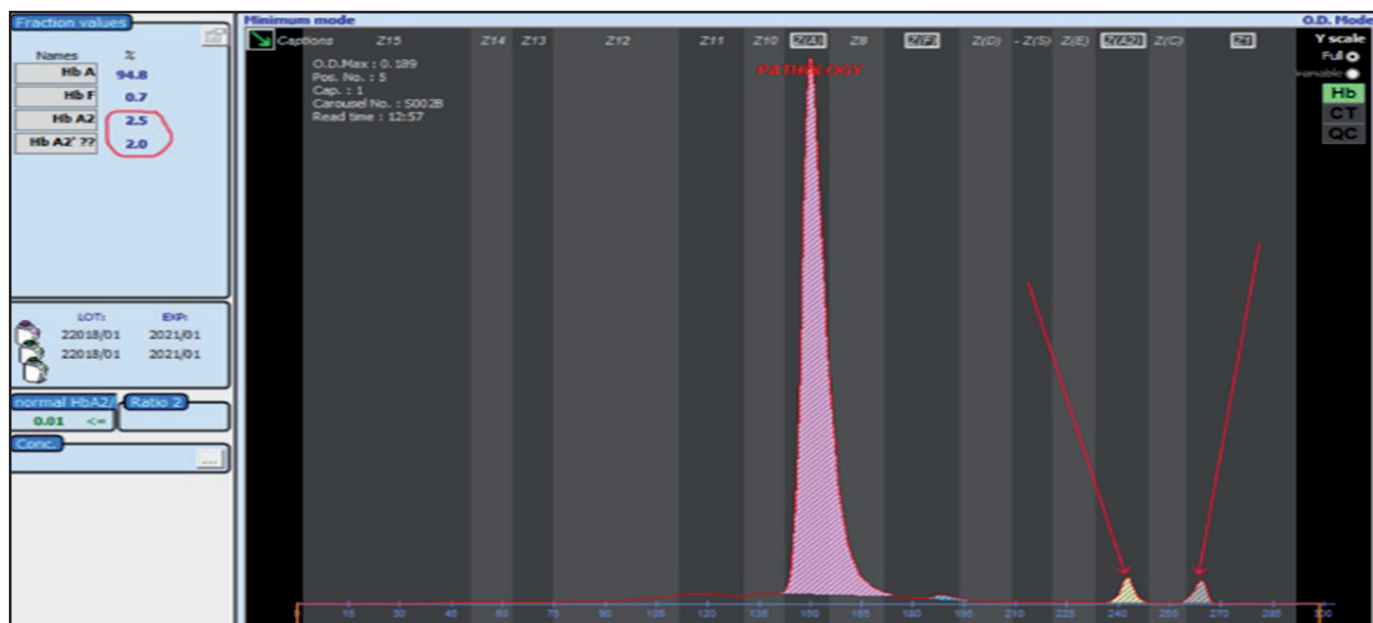
С особено внимание да се интерпретират граничните стойности на Hb A2 и увеличеният Hb F!

Нормален хемоглибинов профил без съпоставка с кръвна картина и анамнеза НЕ изключва наличието на хемоглибинопатия!

Нормална стойност на хемоглибина и кръвна картина



Фигура 1. Хетерозиготна δ-таласемия: HGB 133,0; MCV 86,0; MCH 29,2; Fe 16,5; HbA2+HbA2'=2,5%



Фигура 2. Комбинация с на δ - с β -таласемия: HGB 102,0; MCV 67,1; MCH 19,9; Fe 9,9; HbA2+HbA2'=4,5%

без изменения HE изключват наличието на хемоглобинопатия!

HE всички изменения в хемоглобиновия профил се дължат на наследствен фактор!

Заклучение

За намаляване на риска от подобни грешки и пропуски, диагностичните лаборатории са длъжни:

- да прилагат подходящи работни процедури и спазват стандартните оперативни протоколи;
- да участват във външен лабораторен контрол за диагностика на таласемии и аномални хемоглобини – гаранция за добра лабораторна практика;
- да изискват допълнителна информация, имаща отношение към диагностицирането на хемоглобинопатия за всеки изследван пациент (анамнеза, други лабораторни изследвания и пр.);
- да интерпретират цифровите данни от изследването в светлината на предоставената допълнителна информация, като предоставят текстово заключение и/или коментар;
- да правят преценка за генетичния риск и дават препоръки на лекуващия лекар и пациента.

Благодарности

С признателност за помощта на незаменимата наша сътрудничка Елена Асенова Арсова-Стамболийска.

Библиография

1. A Database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemia mutations. <https://globin.bx.psu.edu/hbvar/menu.html>
2. Eleftheriou A, Angastiniotis M. Haemoglobin Disorders

(Haemoglobinopathies). Beta (β) Thalassemia. Alpha (α) Thalassemia. Sickle Cell Disorders. TIF Publication No12, Team up Creations Ltd, Nicosia, Cyprus. (2011) ISBN: 978-9963-623-96-9

3. Работна група БМДКТХ. Бета-таласемия. Наръчник за клинично поведение. София, 2007
4. Daniel Y, Henthorn J. NHS Sickle Cell and Thalassemia Screening Programme. Handbook for antenatal laboratories. Public Health England leads the NHS Screening Programmes, Oct. 2017, PHE publications gateway number: 2017345
5. Schuh A. Guidance notes for Haematology laboratories in England for the referral of antenatal patient samples to the DNA laboratories for haemoglobinopathy mutation analysis. NHRL DNA Referral Guidance Version 4. 28/02/17
6. Old J, Traeger-Synodinos J, Petrou M, et al. Prevention of Thalassemias and Other Haemoglobin Disorders Vol. 2. Laboratory Protocols, second update, Publisher Thalassemia International Federation Publications, Team up Creations Ltd, Nicosia, Cyprus. (2012)
7. Traeger-Synodinos J, Hartevelde CL, Old JM, et al.; EMQN haemoglobinopathies best practice meeting. EMQN Best Practice Guidelines for molecular and haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies. Eur J Hum Genet. 2015 Apr;23(4):426-37.
8. Ryan K, Bain BJ, Worthington D, et al.; British Committee for Standards in Haematology. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. Br J Haematol. 2010 Apr;149(1):35-49.
9. Bain BJ. Haemoglobinopathy diagnosis. Oxford: Blackwell Science, 2006
10. Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR et al. Disorders of Hemoglobin. Second Edition. Cambridge University Press, 2009.
11. Voskaridou E, Angastiniotis M, Boutou E, et al. ENERCA WP4. Sickle Cell Disorders. Haemoglobinopathies. D21 General Recommendations about Antenatal Screening, Prenatal Screening and Genetic Counselling of Haemoglobinopathies. 2012, 2-18 On behalf of Enerca <http://www.enerca.org>
12. Vives Corrons JL, Mañú Pereira M, Romeo-Casabona C et al. The ENERCA White Book. Recommendations for centres of expertise in rare anaemias. 4th Pan-European Conference on Haemoglobinopathies and Rare Anaemias, Thalassemia Reports 2014; volume 4:4878

13. Stephens AD, Angastiniotis M, Baysal E, et al; International Council for the Standardisation of Haematology (ICSH). ICSH recommendations for the measurement of haemoglobin A2. *Int J Lab Hematol.* 2012 Feb;34(1):1-13.
14. Stephens AD, Angastiniotis M, Baysal E, et al; International Council for The Standardisation of Haematology (ICSH). ICSH recommendations for the measurement of haemoglobin F. *Int J Lab Hematol.* 2012 Feb;34(1):14-20.
15. Stephens AD, Colah R, Fucharoen S, et al.; International Council for Standardization in Haematology (ICSH). ICSH recommendations for assessing automated high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis equipment for the quantitation of HbA2. *Int J Lab Hematol.* 2015 Oct;37(5):577-82.
16. Keren DF, Hedstrom D, Gulbranson R, et al. Comparison of Sebia Capillary capillary electrophoresis with the Primus high-pressure liquid chromatography in the evaluation of hemoglobinopathies. *Am J Clin Pathol.* 2008 Nov;130(5):824-31.
17. Filon D, Rotschild M, Temin F, et al. Rare Hb variant, not identified by HPLC, is identified by Capillary electrophoresis – Case study. Poster presented at the Israel Society for Clinical Science Conference, 2014
18. Greene DN, Pyle AL, Chang JS, et al. Comparison of Sebia Capillary Flex capillary electrophoresis with the BioRad Variant II high pressure liquid chromatography in the evaluation of hemoglobinopathies. *Clin Chim Acta.* 2012 Aug 16;413(15-16):1232-8.
19. Giordano PC. Carrier Diagnostics and Prevention of Hemoglobinopathies using Capillary Electrophoresis. 2007 Laboratories SEBIA, Lisses, ISBN 978-2-95308449-1-7
20. Giordano PC. Strategies for basic laboratory diagnostics of the hemoglobinopathies in multi-ethnic societies: interpretation of results and pitfalls. *Int J Lab Hematol.* 2013 Oct;35(5):465-79.
21. Denic S, Agarwal MM, Al Dabbagh B, et al. Hemoglobin A2 Lowered by Iron Deficiency and α -Thalassemia: Should Screening Recommendation for β -Thalassemia Change? *ISRN Hematol.* 2013;2013:858294.
22. Keramati MR, Maybodi NT. The effect of iron deficiency anaemia (IDA) on the HbA2 level and comparison of hematologic values between IDA and thalassemia minor. *International Journal of Hematology and Oncology* 2007;17:151-156.
23. Oleske D, Huang RSP, Dasgupta A, et al. Higher Sensitivity of Capillary Electrophoresis in Detecting Hemoglobin A2'. *Am J Clin Pathol* 2012;138:A186.
24. González Borrachero ML, de la Fuente-Gonzalo F, González FA, et al. Delta(0)-thalasemia por inserción de 27 pares de bases en el gen δ -globina con descenso de los valores de hemoglobina A2. *Med Clin (Barc).* 2015 Apr 8;144(7):312-6.
25. Mahmud N, Maffei M, Mogni M, et al. Hemoglobin A2 and Heterogeneous Diagnostic Relevance Observed in Eight New Variants of the Delta Globin Gene. *Genes (Basel).* 2021 Nov 19;12(11):1821.