

Artikelen

α -Thalassemie, een vergelijkend onderzoek op DNA niveau

B.R. van NEERBOS¹, M.G.J. TILANUS², W.W. van SOLINGE⁴, B.A. van OIRSCHOT³, Y.M.G. SCHMIDT¹,
A.G.M. BOUWENS², R.J. KRAAIJENHAGEN⁴ en G. RIJKSEN³

Doel van deze studie is het vergelijken van twee DNA methoden om de meest voorkomende deleties van α -thalassemie te diagnostiseren.

De studie werd opgezet met een groep van 42 patiënten, waarbij geen aannemelijke oorzaak gevonden kon worden voor de microcytaire anaemie. Zij werden onderzocht op α -thalassemie.

Gebruik gemaakt werd van PCR-methoden met verschillende primerparen en RFLP-methoden met verschillende restrictie enzym/probe combinaties.

Bij 21 van de 42 patiënten kon een afwijking in het α -globine-gencluster worden aangetoond. De afwijkingen bij 19 patiënten uit deze groep werden gedetecteerd m.b.v. de verschillende RFLP- en PCR-methoden, de afwijkingen bij twee patiënten alleen m.b.v. de RFLP-methoden.

Geconcludeerd kan worden, dat voor het onderzoek naar α -thalassemie de hier beschreven PCR-methoden en de RFLP-methoden vergelijkbare resultaten geven. Bij een op dergelijke wijze geselecteerde groep van 42 patiënten kon in 50% van de gevallen een vorm van α -thalassemie als oorzaak worden aangemerkt. Bij patiënten met microcytaire anaemie, waarbij ijzerdeficiëntie, chronisch inflammatoire ziekten, hemoglobinopathie en β -thalassemie uitgesloten zijn, dient onderzoek naar α -thalassemie te worden verricht.

Trefwoorden: α -thalassemie; PCR; RFLP; Southern hybridisatie

Thalassemieën kunnen worden omschreven als klinische afwijkingen ten gevolge van veranderingen in de DNA structuur van de α - en β -globine genclusters. Deze veranderingen resulteren in een gedeeltelijke of volledige afwezigheid van resp. α - of β -globine ketens van het hemoglobine molecuul.

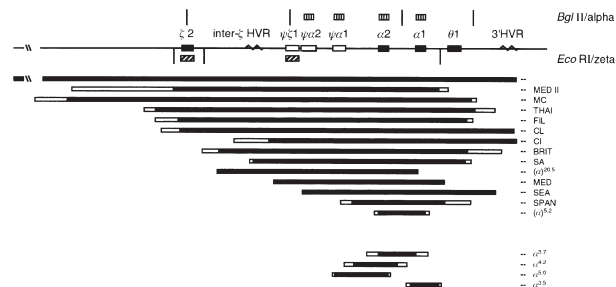
Thalassemieën hebben hun oorsprong voornamelijk onder de bevolking rondom het Middellandse-Zeegebied, in Afrika en in Azië (1). Ook onder de ne-

groïde bevolking in het Caribische gebied en de Verenigde Staten komt α -thalassemie voor (2,3). Gezien de huidige migratie van de wereldbevolking wordt men in toenemende mate ook in Nederland met deze ziekte geconfronteerd. Spit (4), die de incidentie in Nederland voor β -thalassemie en hemoglobinopathieën beschreef, concludeerde dat deze ziekten hier meer voorkomen dan men vermoedde. De Korte (5) heeft aangetoond, dat voor α -thalassemie in dit verband waarschijnlijk hetzelfde geconstateerd kan worden.

Het onderzoek op β -thalassemie wordt reeds lang verricht in de laboratoria van algemene ziekenhuizen. Dit onderzoek berust op het aantonen van veranderingen in de verhouding tussen de verschillende hemoglobine-fracties, namelijk HbA($\alpha_2\beta_2$), HbA₂($\alpha_2\delta_2$) en HbF($\alpha_2\gamma_2$), in het bloed. Dit geschiedt d.m.v. elektroforetische of chromatografische technieken.

α -Globine ketens echter vormen een bestanddeel van alle hemoglobine-fracties, een verminderde synthese hiervan kan dus niet met behulp van bovengenoemde methoden gedetecteerd worden. Hoewel men onderzoek kan doen naar de synthese-snelheidsratio van de globine-ketens, verdient onderzoek op DNA-niveau de voorkeur voor diagnostiek van α -thalassemieën. Met name bij α -thalassemie-2 en gecombineerde α/β thalassemieën is er een duidelijke overlap met het referentie-gebied (5,6,7,8).

α -Thalassemieën kunnen ontstaan ten gevolge van een scala van veranderingen in het gebied van het α -globine gencluster (9,10). Dit zijn meestal deleties, waarbij één of beide α -genen op een chromosoom afwezig zijn (zie figuur 1), maar in een aantal gevallen



Figuur 1. α -Globine gencluster met de restrictie plaatsen van BglII en EcoRI en de aanhechtingsplaatsen van de α -probe en de ζ -probe. De gesloten rechthoekjes zijn de genen, de open rechthoekjes de pseudogenen. De zwarte balken zijn een aantal van de deleties, de open uiteinden duiden aan de variabiliteit in de lengten van de deleties.

Ziekenhuis Rijnstate¹, Arnhem; Afdeling Pathologie, Divisie Moleculaire Pathologie² en Laboratorium Medische Enzymologie³, Academisch Ziekenhuis Utrecht; Ziekenhuis Eemland⁴, Amersfoort

Correspondentie: Dr. G. Rijkse, Laboratorium Medische Enzymologie, Academisch Ziekenhuis, postbus 85500, 3508 GA Utrecht.

Ingekomen: 09.01.96

Tabel 1. Hematologische gegevens van de onderzochte patiëntenpopulatie

Bepaling	ref. waarden	patiënten	
		gemiddeld	range
MCV (fl)	85 - 103	70	55 - 80
MCH (fmol)	1,70 - 2,20	1,44	0,97 - 2,18
MCHC (mmol/l)	19,3 - 22,7	20,7	17,2 - 22,4

Tabel 2. Gevonden afwijkingen in het α -gen cluster

Gevonden afwijking	patiënten	methode	
		PCR	RFLP
$-\alpha(3.7)/\alpha\alpha$	7	+	+ ¹
$-\alpha(3.7)/\alpha\alpha\alpha$	1	+	+
$-\alpha(3.5)/\alpha\alpha$	2	-	+
$-\alpha(3.7)/-\alpha(3.7)$	3	+	+
$--(SEA)/\alpha\alpha$	4	+	+
$-\alpha(3.7)/--(SEA)$	2	+	+
$\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$	2	+	+
Totaal	21		

+: aangetoond; -: niet aangetoond; ¹: de $-\alpha(3.7)$ is bij de RFLP-methoden alleen als $-\alpha$ -deletie aantoonbaar.

betreffen dat slechts enkele nucleotiden (11). Daarnaast zijn er vormen van zogenaamde non-deletionale α -thalassemie, zoals puntmutaties (12) of toevoeging van één of meerdere nucleotiden. Hierdoor kan een gestoorde aanmaak van α -globuline ketens ontstaan maar ook stoornissen in de transcriptie naar het messenger RNA (mRNA), dus in de vertaling van de genetische informatie naar de synthese van het globine molecuul.

Het doel van deze studie was om twee verschillende methoden voor DNA-onderzoek in de klinische laboratoriumdiagnostiek, namelijk de Polymerase Chain Reaction methoden (PCR) en de methoden die berusten op de Restriction Fragment Length Polymorphism met Southern hybridisatie (hier RFLP genoemd), te evalueren.

Patiënten

Dit onderzoek werd uitgevoerd bij 42 patiënten, die geselecteerd zijn op basis van verdenking op een afwijkende synthese van de α -globine keten. Deze patiënten hadden allen een microcytaire anaemie, die niet veroorzaakt werd door ijzeregebrek. Ook is met behulp van een HPLC-methode β -thalassemie of een hemoglobopathie uitgesloten. Daar het materiaal van een aantal patiënten vanuit andere instellingen naar ons is toegezonden, werd een selectie-criterium van een MCV < 80 fl gehanteerd, waardoor de aanwezigheid van een chronisch inflammatoire ziekte bij deze patiëntengroep onwaarschijnlijk geacht werd. Ook was de etnische oorsprong vaak niet te achterhalen.

De hematologische parameters van de onderzochte groep patiënten zijn weergegeven in tabel 1.

Methoden

Het DNA is geïsoleerd en gezuiverd uit leukocyten volgens de uitzoutingsmethode volgens Miller (13). De PCR-methoden zijn uitgevoerd met diverse primerparen. Per primerpaar kan één specifieke deletie worden aangetoond. De afwezigheid van beide α -genen op een chromosoom, resulterend in een α -thalassemie type 1, kon in dit onderzoek worden aangetoond met behulp van primerparen voor de volgende deleties: de $--(SEA)$ deletie (South East Asian), de $--(MED)$ deletie (Mediterranean) en de $--(20.5)$ deletie (14). Daarnaast werden primerparen gebruikt voor detectie van de $-\alpha(3.7)$ deletie (15) en de $-\alpha(4.2)$ deletie, waarmee de afwezigheid van één α -gen per chromosoom, resulterend in een α -thalassemie type 2, kan worden aangetoond. Als uitgangspunt voor het ontwerp van de PCR-methoden is ervan gebruik gemaakt, dat de identificatie geschiedt middels positieve signalen. Deleties werden dus aangetoond met behulp van primerparen, die uitsluitend bij aanwezigheid van de deletie een positief signaal geven en niet door het afwezig zijn van een signaal. Evenzo werd de afwezigheid van een deletie middels positieve signalen vastgesteld met behulp van een ander primerpaar.

Bij de RFLP-methoden is in dit onderzoek gewerkt met twee verschillende restrictie enzym/probe combinaties, n.l. *Bgl* II met de α -probe (16) en *Eco* RI met de zèta-probe, zoals beschreven is door Schmidt (17). Beide probes zijn gelocaliseerd in het α -globine gencluster, zie figuur. Met deze beide combinaties kan een breder scala aan deleties worden onderzocht dan wanneer slechts één combinatie van restrictie enzym en probe wordt gebruikt. De detectie is uitgevoerd met behulp van de DIG-chemiluminescentie methode (Fa. Boehringer Mannheim).

Resultaten

Van de 42 patiënten, die in dit onderzoek werden betrokken, konden er bij 21 met de gebruikte methoden een afwijking in het α -globine gencluster worden gevonden (zie tabel 2). De $-\alpha(3.7)$ deletie en de $--(SEA)$ deletie kwamen het meest frequent voor, n.l. bij resp. 13 en 6 patiënten. Bij twee patiënten werd een combinatie van beide deleties gevonden, deze hebben slechts één normaal functionerend α -gen. Die patiënten zijn heterozygoot voor zowel α -thalassemie type 1 als type 2. Dit wordt de HbH-ziekte genoemd naar de aanwezigheid van hemoglobine H-moleculen, welke 4 β -globine ketens bevat.

De beide patiënten met een $-\alpha(3.5)$ deletie konden met deze PCR-methoden niet worden gevonden daar op deze deletie niet gescreend werd. Deze deletie werd wel met de RFLP-methoden gedetecteerd. Bij deze vorm van α -thalassemie is het α_1 -gen afwezig, waardoor een geheel ander Southern blotpatroon ontstaat dan bij de $-\alpha(3.7)$ en $-\alpha(4.2)$ deleties, een ~ 4 kb-deletie waarbij het α_2 -gen ontbreekt. Daar de elektroforetische scheiding op basis van molecuulgrootte geschiedt, is het moeilijk om een onderscheid te maken tussen een deletie van 3.7 kb en van 4.2 kb.

Van de drie patiënten met een $\alpha\alpha\alpha$ -triplet was dit bij twee de enige gedetecteerde afwijking. Er werden in

Tabel 3. Afwijkingen in de hematologische parameters

Patiënten	n	MCV (fl)		MCH(fmol)	
		gem.	range	gem.	range
Geen afwijking	22	70	58-80	1,49	1,21-2,18
$-\alpha/\alpha\alpha$	10	72	55-79	1,43	0,97-1,66
$--(\text{SEA})/\alpha\alpha$	4	65	62-70	1,29	1,23-1,36

de onderzochte patiëntenpopulatie geen $-\alpha(4.2)$, $--(\text{MED})$ en $--(20.5)$ deleties gevonden. Bij 22 patiënten kon geen afwijking in het α -globine gen cluster worden gevonden.

De hematologische parameters tonen een tendens naar lagere waarden naarmate het aantal actieve α -genen afneemt (tabel 3). Echter, gezien de geringe aantallen van ieder der groepen is er geen statistisch significante betekenis aan toe te kennen. De MCV waarden van de vier patiënten met een $--(\text{SAE})$ deletie zijn 62, 63, 65 en 70 fl.

Discussie

De frequentieverdeling van de aangetoonde deleties in dit onderzoek is in overeenstemming met gegevens uit de literatuur (15,16,18,19,20). De $-\alpha(3.7)/\alpha\alpha$ en de $--(\text{SEA})/\alpha\alpha$ thalassemieën waren in dit onderzoek de meest voorkomende afwijkingen en vormden 90% van de patiënten met gevonden afwijkingen op het gebied van de α -thalassemieën. Patiënten met het genotype $--(\text{MED})/\alpha\alpha$ werden in dit onderzoek niet gevonden, hoewel er wel op getest is. Waarschijnlijk hangt dit van de samenstelling van de populatie af.

Er was een goede overeenstemming tussen de RFLP-methoden en de PCR-methoden, in aanmerking genomen de specifieke mogelijkheden betreffende de detectie en interpretatie van de gebruikte methoden. Geen enkele keer werd er een tegenstelling tussen de resultaten gevonden. De $-\alpha(3.7)$ deleties werden allen gevonden met behulp van PCR-methoden. Met de RFLP-methoden kon geen onderscheid worden gemaakt tussen $-\alpha(3.7)$ en $-\alpha(4.2)$ deleties. Echter werden in al deze gevallen wel een deletie van ~4 kb van het α_2 -gen gevonden, dus een $-\alpha/\alpha\alpha$ thalassemie. Bij twee van de patiënten werd met de PCR een normaal resultaat verkregen en gaf de RFLP een afwijkend beeld, namelijk een $-\alpha(3.5)$ deletie. Opgemerkt dient te worden dat onderzoek op deze deletie met de PCR-methode hier niet is meegenomen aangezien de $-\alpha(3.5)/\alpha\alpha$ thalassemie waarschijnlijk minder frequent voorkomt.

Bij 3 patiënten werd een $\alpha\alpha\alpha$ -triplet aangetoond. Een $\alpha\alpha\alpha$ -triplet kan ontstaan door een cross-over van een α -gen van het ene chromosoom naar het andere (9,10). Hierbij ontstaat dan op het eerste chromosoom een $-\alpha(3.7)$ deletie. Het derde α -gen op het andere chromosoom kan niet overgeschreven worden naar RNA en is dus niet actief. Aanwezigheid van een extra α -gen alleen, zoals het genotype $\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$ of $\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$, geeft geen hematologische afwijkingen. De thalassemie bij één van deze drie patiënten is in dit geval ontstaan t.g.v. een deletie op het andere chromosoom.

De PCR-methoden zijn relatief snel uit te voeren. Daar tegenover staat dat een PCR-reactie specifiek is voor slechts één vooraf gekozen deletie. Voor iedere deletie zal een afzonderlijk primerpaar moeten worden gebruikt. Het zal dus afhankelijk zijn van het aantal verschillende primerparen hoeveel verschillende deleties kunnen worden aangetoond en welke dat zijn. In de praktijk zal m.b.v. van deze methoden slechts naar de meest voorkomende afwijkingen gezocht kunnen worden. Amplificatie van α -globinegenen is echter niet eenvoudig. De condities waaronder de PCR moet worden uitgevoerd en de samenstelling van de primers luisteren zeer nauw, de interpretatie van de resultaten kan moeilijk zijn. Daarom is het ons inziens noodzakelijk de conclusies te baseren op positieve signalen. Het afwezig zijn van een signaal mag niet worden geïnterpreteerd als het aanwezig zijn van de deletie. De RFLP-methoden hebben het voordeel, dat in eenzelfde test een ruimer scala van deleties onderzocht kan worden dan bij de PCR, mits er meerdere enzym/probe combinaties worden gebruikt. Hiermee ook kunnen minder frequent voorkomende deleties worden aangetoond, danwel een aanwijzing geven voor de aanwezigheid van een zelden voorkomende afwijking in het α -gencluster (20,21). Een tweede reden voor het gebruik van meerdere enzym/probe combinaties is dat het resultaat van de ene enzym/probe combinatie altijd bevestigd dient te worden als controle door een test met een ander enzym of probe of beiden (de Korte, 5). RFLP-methoden zijn echter wel bewerkelijker.

Bij het maken van een keuze tussen de verschillende methoden en technieken dienen een aantal overwegingen te worden gemaakt. Deze zullen afhankelijk zijn van de frequenties, waarin de verschillende deleties voorkomen, maar ook van de toegankelijkheid van het laboratoriumonderzoek. De PCR is snel uit te voeren en minder arbeidsintensief dan de RFLP. Daartegenover staat, dat veel primerparen noodzakelijk zijn en daarmee een groot aantal PCR-reacties gedaan moeten worden.

Men dient altijd bedacht te zijn op aanwezigheid van meerdere deleties, zoals bij de HbH-ziekte, maar ook op minder voorkomende afwijkingen, zoals b.v. een $-\alpha(3.5)$ deletie of een Constant-Spring-puntmutatie (22,23). In de praktijk zijn slechts hierin gespecialiseerde laboratoria in staat om deze veranderingen op DNA-niveau zo volledig mogelijk aan te tonen. Gezien het feit, dat er nog steeds nieuwe mutaties worden ontdekt en ook mutaties spontaan kunnen ontstaan (24), is het niet mogelijk met 100% zekerheid een vorm van α -thalassemie te kunnen uitsluiten. Echter bij een goede manier van screening kunnen de meest voorkomende deleties worden aangetoond.

Het onderzoek op thalassemie is geïndiceerd bij patiënten met een microcytaire hypochrome anemie, waarbij geen andere oorzaak, zoals ijzerebrek of een chronisch inflammatoire ziekte, voor de anemie gevonden kan worden. Hiermee kunnen de onnodige en voor sommigen gevaarlijke ijzertherapie danwel de belastende periodieke controles worden voorkomen. Om die redenen is de diagnose α -thalassemie eveneens in het belang van familieleden en met name de

kinderen van deze patiënten. Zonodig kunnen de patiënten worden doorverwezen naar een klinisch-genetisch centrum voor advisering.

De aard van de deletie kan afhankelijk zijn van de geografische herkomst van de patiënt en zijn voorouders. Hoewel de hematologische parameters lagere waarden tonen naarmate er minder actieve α -genen aanwezig zijn, kan evenwel op basis hiervan geen uitspraak worden gedaan omtrent de ernst van de afwijking (19,20).

Bij de helft van de patiëntengroep in deze studie werd een α -thalassemie aangetoond, bij de anderen kon geen bevredigende verklaring voor de anemie worden gevonden. Mogelijk kunnen hier puntmutaties of zeldzame afwijkingen binnen het α -gencluster de oorzaak van de microcytaire anaemie zijn.

De auteurs danken dr. J.M.Werre, internist-hematoloog, voor het kritisch doornemen van dit artikel.

Literatuur

- Hill AVS. Molecular epidemiology of the thalassaemias (including haemoglobin E). *Baillière's Clinical Haematology* 1992; 5: 209-238.
- Dijks FPL van der, Berg GA van den, Schermer JG, Muskiet FD, Landman H, Muskiet FAJ. Screening cord blood for hemoglobinopathies and thalassaemia by HPLC. *Clin Chem* 1992; 38: 1864-1869.
- Higgs DR, Pressley L, Clegg JB, Weatherall DJ, Serjeant GR. Alpha-thalassaemia in black populations. *John Hopkins Med J* 1980; 146: 300-310.
- Spit AWM, Schulpen TWJ. Hemoglobinopathiën in Nederland; is screening bij buitenlandse vrouwen wenselijk? *Ned Tijdschr Geneesk* 1992; 136: 869-871.
- Korte D de, Cuypers HTM, Klein A de, Winkel I, Vuil H, Roos D. Moleculair-genetisch onderzoek bij α -thalassemie in Nederland. *Ned Tijdschr Geneesk* 1992; 136: 872-875.
- Giordano PC. Decision making in postnatal hematological analysis of hemoglobinopathies. *Boerhave cursus* 1994; 29-39.
- Sheng-Fung L, Ta-Chih L, Tyen-Po C, Shyh-Shin C, Hong-Wen L, Jan-Gowth C. Diagnosis of thalassaemia by non-isotope detection of α/β and ζ/α mRNA ratios. *Brit J Haematol* 1994; 87:133-138.
- Galanello R, Paglietti MA, Crobu MG, et al. Interaction of heterozygous β -thalassaemia with single functional α -globin gene. *Am J Hematol* 1988; 29: 63-66.
- Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AOM, Pretorius IM, Jarman AP, Weatherall DJ. A review of the molecular genetics of the human α -globin gene cluster. *Blood* 1989; 73: 1081-1104.
- Higgs DR, Weatherall DJ. α -Thalassaemia. *Baillière's Clinical Haematology* 1993; 6: 117-150.
- Harteveld CL, Losekoot M, Haak H, Heister JGAM, Giordano PC, Bernini LF. A novel polyadenylation signal mutation in the α_2 -globin gene causing α -thalassaemia. *Brit J Haematol* 1994; 87: 139-143.
- Hall GW, Thein SL, Newland AC, et al. A base substitution (T->C) in codon 29 of the α_2 -globin gene causes α thalassaemia. *Brit J Haematol* 1993; 85: 546-552.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res* 1988; 16: 1215-1218.
- Bowden DK, Vickers MA, Higgs DR. A PCR-based strategy to detect the common severe determinants of α -thalassaemia. *Brit J Haematol* 1992; 81: 104-108.
- Dodé C, Krishnamoorthy R, Lamb J, Rochette J. Rapid analysis of $-\alpha(3.7)$ thalassaemia and $\alpha\alpha\alpha$ (anti 3.7) triplication by enzymatic amplification analysis. *Brit J Haematol* 1992; 82: 105-111.
- Embury SH, Miller JA, Dozy AM, Kan YW, Chan V, Todd D. Two different molecular organisations account for the single α -globin gene of the α -thalassaemia-2 genotype. *J Clin Invest* 1980; 66: 1319-1325.
- Schmidt-Hieltjes YMG, Neerbos BR van. DNA in de laboratoriumdiagnostiek. Onderzoek naar α -thalassaemie. *Analyse* 1995; 50: 124-127.
- Bernini LF. Hemoglobin research and diagnostics in the Netherlands. *Hemoglobinopathies and today's genetics*. Boerhave Cursus 1994; 77-97.
- Baysal E, Kleanthous M, Bozkurt G, et al. α -Thalassaemia in the population of Cyprus. *Brit J Haematol* 1995; 89:496-499.
- Liang R, Liang S, Jiang NH, et al. α and β thalassaemia among Chinese children in Guangxi Province, P.R.China: molecular and haematological characterization. *Brit J Haematol* 1994; 86: 351-354.
- Fischel-Ghodsian N, Vickers MA, Seip M, Winickagoon P, Higgs DR. Characterization of two deletions that remove the entire human ζ - α globin gene complex (--Thai and --Fil). *Brit J Haematol* 1988; 70: 233-238.
- Hsia YE, Ford CA, Shapiro LJ, Hunt JA, Ching NS. Molecular screening for haemoglobin Constant Spring. *Lancet* 1989; i: 988-990.
- Kropp GL, Fucharoen S, Embury SH. Selective enzymatic amplification of α_2 -globin DNA for detection of the hemoglobin Constant Spring mutation. *Blood* 1989; 73: 1987-1992.
- Sabath DE, Detter JC, Tait JF. A novel deletion of the entire α -globin locus causing α -thalassaemia-1 in a northern European family. *Am J Clin Pathol* 1994; 102: 650-654.

Summary

α -Thalassaemia, a comparative investigation at DNA level. Neerbos BR van, Tilanus MGJ, Solinge WW van, Oirschot BA van, Schmidt YMG, Bouwens AGM, Kraaijenhagen RJ and Rijksen G. Ned Tijdschr Klin Chem 1996; 21: 193-196.

Objective: comparison of two different DNA methods to detect most of the α -thalassaemia deletions.

Setting: a group of 42 patients with a microcytic blood picture of unknown origin were investigated for α -thalassaemia.

Methods: PCR methods with various primer combinations were used and RFLP-methods with various restriction enzyme/probe combinations.

Results: In 21 of 42 patiënten a defect in the α -globin gene cluster could be proven. The defects in 19 of these 21 patients were analysed by means of both PCR and RFLP methods, the defect of the remaining two patients was detected by the RFLP methods only.

Conclusions:

- For investigation of α -thalassaemia the described PCR and the RFLP methods showed comparable results
- In a population of 42 of these patients, in 50% of the cases, a kind of α -thalassaemia could be found as the cause of the anemia
- In patients with a microcytic anemia for whom the diagnosis of iron deficiency, chronic inflammatory disease, hemoglobinopathy and β -thalassaemia are excluded, testing for α -thalassaemia is advisable.

Keywords: α -thalassaemia; PCR; RFLP; Southern hybridisation