

## Pendekatan Diagnosis Berbasis Molekuler pada Pasien Talasemia

Bagus Pratama<sup>1</sup>, Intanri Kurniati<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung

<sup>2</sup>Bagian Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Lampung

### Abstrak

Talasemia adalah penyakit kelainan darah merah yang merupakan salah satu penyebab kematian dan kesakitan di Indonesia. Penyakit ini terjadi akibat kelainan genetik yang menyebabkan kegagalan sintesis rantai globin. Rantai globin merupakan salah satu penyusun hemoglobin sehingga kelainan pada susunan hemoglobin akan mengakibatkan kelainan elastisitas dan lisisnya eritrosit. Kelainan ini bermanifestasi klinis beragam mulai anemia, pucat, lemah, nyeri, kelainan pada tulang hingga ikterus dan hepatosplenomegali. Diagnosis talasemia pada umumnya hanya menggunakan pemeriksaan hematologi lengkap mencakup hitung jumlah eritrosit, kadar hemoglobin, kadar hematokrit, MCV dan MCH, pemeriksaan darah samar serta elektroforesis hemoglobin. Pemeriksaan genetik dalam pendekatan diagnosis berbasis molekuler merupakan pemeriksaan yang akan memberikan hasil perubahan sekuens gen atau mutasi genetik yang akan berpengaruh pada perbedaan gambaran manifestasi klinis dan tingkat keparahan pasien talasemia. Diagnosis molekuler dapat dilakukan dalam upaya peningkatan penatalaksanaan yang efektif dan kualitas hidup pasien.

**Kata kunci:** Diagnosis molekuler, pemeriksaan genetik, talasemia

## The Molecular-Based Diagnostic Approach on Thalassemia Patient

### Abstract

Thalassemia is a red blood disorder which is one of the causes of death and illness in Indonesia. This disease occurs due to genetic disorder that affect the inability of a person to synthesize globin chains. A globin chain is one of the constituents of hemoglobin so that abnormality of composition of hemoglobin will cause abnormality of elasticity and lysis of the erythrocytes. This disorder has various clinical manifestations ranging from anemia, pale, fatigue, pain, abnormalities in the bone (thalassemic facie) to jaundice and hepatosplenomegaly. Generally, the diagnosis of thalassemia uses a complete blood count including calculating the number of erythrocytes, hemoglobin levels, hematocrit levels, MCV and MCH, blood smear examination and hemoglobin electrophoresis. The genetic examination on molecular-based diagnostic approach is an examination to get a result of changes in gene sequences or genetic mutations that will affect the difference of clinical manifestation and severity of thalassemia patients. Molecular diagnosis can be made in an effort to improve the effective management and the quality of life of patients.

**Keywords:** Genetic examination, molecular diagnosis, thalassemia

Korespondensi: Bagus Pratama, alamat Jl. Purnawirawan Gg. Swadaya 2, Gunung Terang, Langkapura, Bandar Lampung. Telepon 081278563319, surel baguspratama1999@gmail.com; Intanri Kurniati, alamat Jl. Hj. Husin No. 118 Pengajaran, Teluk Betung Utara, Bandar Lampung. Telepon 08122343175, surel intanridr@gmail.com

### Pendahuluan

Talasemia merupakan masalah kesehatan di dunia. Penyakit ini tersebar luas pada populasi dunia termasuk negara-negara Mediterania, Afrika, Asia Selatan, Asia Tenggara. Pada populasi dunia diperkirakan 5% mempunyai varian globin yang diantaranya 1,7% merupakan  $\alpha$  dan  $\beta$  talasemia trait atau setara dengan 4,4 penderita pada setiap 1000 kelahiran.<sup>1</sup> Setiap tahunnya, diperkirakan 2500 bayi baru lahir dengan talasemia yang menimbulkan angka kematian dan kesakitan yang tinggi di Indonesia. Prevalensi pembawa sifat talasemia di Indonesia diperkirakan 1-10% (talasemia- $\alpha$ ) dan 3,7% (talasemia- $\beta$ )<sup>2,3</sup>

Talasemia merupakan penyakit kelainan darah genetik yang menyebabkan penurunan produksi hemoglobin akibat penurunan atau tidak terbentuknya rantai globin ( $\alpha$ -globin dan  $\beta$ -globin). Rantai globin merupakan protein fungsional pembentuk hemoglobin yang berfungsi untuk mengikat oksigen pada darah.<sup>4,5</sup> Hal ini dapat menimbulkan keadaan ketidaksempurnaan pembentukan sel darah merah (eritrosit mudah lisis) di dalam tubuh yang akan menimbulkan masalah kesehatan seperti anemia, pucat, nyeri, lemah dan kelainan pada tulang (*thalassemic facie*) serta ikterus dan hepatosplenomegali.<sup>6</sup>

Pada umumnya, talasemia diklasifikasikan menjadi 2 tipe yaitu talasemia  $\alpha$  dan talasemia  $\beta$ . Talasemia  $\alpha$  disebabkan oleh mutasi pada gen HBA1 dan/atau HBA2 kromosom 16 sedangkan Talasemia  $\beta$  disebabkan oleh mutasi pada gen HBB kromosom 11. Keduanya diturunkan secara resesif autosomal.<sup>7</sup> Manifestasi klinis yang ditimbulkan berdasarkan varian globin yang terkena defek. Oleh karena itu, terapi yang diberikan termasuk pemberian transfusi darah akan diselaraskan dengan varian globin yang bermutasi.<sup>8</sup>

Diagnosis talasemia secara konvensional dapat dilakukan dengan pemeriksaan darah tepi dan pemeriksaan darah lengkap seperti hitung jumlah eritrosit, kadar hemoglobin, kadar hematokrit, *mean corpuscle volume* (MCV) dan *mean hemoglobin volume* (MHV) serta elektroforesis hemoglobin. Pemeriksaan laboratorium lainnya juga dilakukan seperti pemeriksaan kadar ferritin serum, *total iron binding capacity* (TIBC), protoporphirin zink dan kadar transferrin.<sup>9</sup>

Pendekatan diagnosis berbasis molekuler dikembangkan guna mencari defek atau mutasi pada gen atau genom suatu individu. Diagnosis genetik dilakukan menggunakan analisis genetik isolat DNA dan melakukan sekuensing serta penerjemahan dan penyelarasan pada *gene bank*. Hal ini dapat memberikan gambaran mutasi pada varian hemoglobin agar terapi yang diberikan efektif. Pemberian terapi yang efektif dapat meningkatkan kualitas hidup dari pasien talasemia.<sup>10,11,12</sup>

## Isi

Talasemia merupakan salah satu penyakit hemoglobinopati yaitu ketidakmampuan tubuh dalam membentuk hemoglobin. Pada kelainan ini didapatkan eritrosit yang tidak paten atau tidak fungsional. Hal ini dikarenakan kurangnya atau tidak terbentuknya rantai globin ( $\alpha$ -globin dan  $\beta$ -globin) yang merupakan salah satu pembentuk hemoglobin. Defisit atau defek pada rantai globin ini disebabkan oleh defek atau mutasi genetik.<sup>13</sup> Penurunan genetik yang terjadi pada kelainan ini bersifat

resesif autosomal. Sifat yang diturunkan berdasarkan kromosom pewaris sifat dengan penderita berupa autosomal homozigot. Hal ini mengindikasikan terdapat 1 alel gen talasemia yang diturunkan oleh masing-masing pewaris sifat.<sup>14</sup>

Secara patofisiologis, pasien talasemia akan mengalami anemia hemolitik kronik yang berkelanjutan. Keadaan ini dikarenakan defisiensi parsial atau total pada sintesis rantai  $\alpha$ -globin atau rantai  $\beta$ -globin yang merupakan pembentuk hemoglobin pada dewasa (major HbA atau tetramer  $\alpha_2\beta_2$ ).<sup>15</sup> Rantai globin yang tidak berpasangan akan cenderung tidak stabil. Keadaan ini akan menimbulkan respons intraselular yaitu hemolisis dari eritrosit. Peningkatan keadaan hemolisis eritrosit mengakibatkan destruksi prematur dengan cara apoptosis dan menurunkan *life-span* eritrosit. Distribusi dan perfusi darah ke jaringan akan menurun berbanding lurus dengan menurunnya produksi dan meningkatnya destruksi eritrosit. Pada fase ini, pasien talasemia mengalami gejala anemia, pucat dan lemah.<sup>16</sup> Pada kondisi lebih lanjut destruksi hemoglobin, heme dan besi akan menimbulkan jejas seluler berupa stres oksidatif. Stres oksidatif dipicu oleh spesies oksigen reaktif yang dihasilkan dari proses reaksi katalisasi kimiawi destruksi eritrosit. Sifat yang ditimbulkan oleh spesies oksigen oksidatif adalah toksik dan dapat menimbulkan masalah di organ seperti hepar dan spleen serta organ endokrin lainnya.<sup>17</sup> Keadaan anemia kronik akan terasosiasi dengan hipoksemia yaitu menurunnya saturasi oksigen di jaringan. Jaringan dari tubuh akan melakukan homeostasis berupa pengaktivasi hormon pembentuk eritrosit atau eritropoetin. Sensitasi eritropoetin diharapkan dapat membuat keadaan menjadi fisiologis.<sup>18</sup> Pada pasien talasemia eritropoetin tidak mampu membentuk eritrosit paten sebagai efek kronis dari talasemia. Ketidakmampuan hormon ini membentuk eritrosit disebut inefektif eritropoiesis.<sup>19</sup> Eritropoiesis ekstramedula primer akan dibentuk oleh hepar dan spleen sebagai kompensasi dari keadaan tersebut. Perubahan struktur dan fungsi dengan keadaan hemolitik terus menerus akan menimbulkan manifestasi mulai

dari ikterus hingga hepatosplenomegali.<sup>20</sup> Kompensasi tubuh lainnya menggunakan mekanisme destruksi kortikal dari tulang yang dapat menyebabkan kelainan pemipihan pada tulang wajah (*thalassemic facie*), kerapuhan pada tulang (osteoporosis) dan rentan terjadi fraktur pada tulang panjang pasien.<sup>19, 20</sup> Di sisi lain, absorpsi besi tanpa penggunaan yang efektif dapat menimbulkan pengendapan besi pada organ tertentu, mulai dari kulit akan menimbulkan gambaran *bronze skin* atau kulit keabuan hingga hemosiderosis pada organ vital lainnya (organ endokrin, jantung).<sup>21</sup> Hal ini dapat diperparah dengan pemberian terapi transfusi darah tanpa kelasi besi.<sup>22</sup>

Pada umumnya, talasemia dibagi menjadi 2 klasifikasi berdasarkan defek pada rantai globinnya yaitu talasemia- $\alpha$  dan talasemia- $\beta$ . Perubahan sekuens gen dapat menimbulkan beberapa penyakit dan manifestasi klinis yang berbeda-beda.<sup>23</sup> Talasemia- $\alpha$  disebabkan oleh defek delesi satu atau lebih pada gen HBA1 dan/atau HBA2 pada kromosom 16.<sup>23</sup> Delesi pada gen tunggal ( $-\alpha/\alpha$ ) akan menghasilkan talasemia- $\alpha$  *silent* karier dengan keadaan asimtomatik dan hematologi normal. Delesi pada 2 gen ( $--/\alpha$ ) akan menyebabkan talasemia- $\alpha$  *trait* (minor) dengan mikrositosis dan tidak terdapat anemia. Pada delesi 3 gen ( $--/-\alpha$ ) menyebabkan talasemia- $\alpha$  *intermedia* atau *HbH disease* (rantai beta<sub>4</sub>) dengan anemia hemolitik, inefektif eritropoesis, kelainan tulang dan splenomegali. Delesi 4 gen ( $---/--$ ) akan menyebabkan talasemia- $\alpha$  *mayor* dan *Hb Bart's syndrome* (rantai gamma<sub>4</sub>). Keadaan ini dapat menyebabkan *hydrops fetalis* pada fetus dan bersifat letal.<sup>24</sup>

Talasemia- $\beta$  disebabkan oleh kebanyakan mutasi titik (200 mutasi) dan sedikit delesi gen HBB pada kromosom 11. Produksi rantai globin  $\beta$  berkisar dari hampir normal hingga tidak ada sama sekali, bergantung kepada tingkat kelebihan rantai globin  $\alpha$  atau produksi rantai globin  $\beta$ . Mutasi atau defek genetik menyebabkan kerusakan pada pemrosesan mRNA, translasi mRNA dan stabilisasi protein. Mutasi talasemia- $\beta$  dikategorikan menjadi talasemia- $\beta^0$ - (talasemia mayor atau *Cooley thalassemia*), talasemia- $\beta^+$ - (talasemia intermedia) dan

talasemia- $\beta^{+-}$ - (talasemia minor atau talasemia *trait* atau talasemia karier) bergantung pada tingkat ekspresi dari gen globin yang termutasi dan sejauh mana output rantai- $\beta$  berkurang.<sup>25</sup> Mutasi yang benar-benar menghapuskan produksi  $\beta$ -globin dikenal sebagai *thalassemia- $\beta^0$*  (tingkat keparahan tinggi), yang meliputi mutasi kodon inisiasi, *nonsense mutation*, *frameshifts*, dan mutasi yang melibatkan penyambungan dan pemrosesan RNA. Sebaliknya, alel talasemia- $\beta^+$  ditandai oleh penurunan rantai  $\beta$  yang ringan hingga sedang yang disebabkan oleh mutasi pada area promotor (baik kotak CACCC atau TATA), *polyadenylation signal* dan daerah 5' atau 3' yang tidak diterjemahkan atau kelainan penyambungan dan pemisahan. Selanjutnya, alel talasemia- $\beta^{+-}$  disebabkan oleh mutasi pada promotor atau daerah 5' mRNA yang diterjemahkan secara bertahap dan hanya memiliki sedikit efek pada produksi rantai  $\beta$ -globin.<sup>26</sup>

Diagnosis talasemia dimulai anamnesis berupa gejala dan tanda disertai riwayat keluarga pasien. Pemeriksaan darah lengkap berupa hitung jumlah eritrosit, kadar hemoglobin, kadar hematokrit, MCV (<80fl), MCH (<27pg). Pemeriksaan darah samar didapatkan lapang pandang mikrositik hipokromatik. Kadar feritin serum >12ng/ml. Pemeriksaan selanjutnya adalah elektroforesis hemoglobin yaitu memisahkan varian hemoglobin termasuk hemoglobin A, hemoglobin F, hemoglobin A2, hemoglobin S dan C. Teknik pemeriksaan adalah sebagai berikut: *cellulose acetate electrophoresis alkaline pH*, *citrate agar electrophoresis acidic pH*, *supravital staining with brilliant cresyl blue* (diagnosis definitif talasemia- $\alpha$ ), *isoelectric focusing* (resolusi baik, sering digunakan secara luas). *High-performance liquid chromatography* (HPLC) merupakan metode pemisahan hemoglobin dengan prinsip kerja pertukaran kation kromatografi. HPLC digunakan sebagai alat ukur kuantitatif pada pemeriksaan elektroforesis hemoglobin.<sup>9, 27</sup>

Modalitas diagnosis berbasis pemeriksaan protein mempunyai keunggulan yaitu efektif biaya dan efisiensi waktu namun mempunyai resolusi yang rendah dan tidak dapat memberikan gambaran defek atau

gangguan genetik yang spesifik. Hal ini dapat memicu ketidakakuratan pada pemberian terapi pasien talasemia yang akan berakibat pada peningkatan komplikasi akibat terapi yang tidak tepat. Oleh karena itu, beberapa cara untuk mendiagnosis talasemia telah dikembangkan sampai saat ini, salah satunya adalah pemeriksaan genetik dengan pendekatan berbasis molekuler.<sup>10, 26</sup>

Pemeriksaan genetik dengan pendekatan berbasis molekuler mempengaruhi akurasi hasil diagnosis dan penilaian tingkat keparahan talasemia. Pendekatan diagnosis berbasis molekuler juga dapat melihat defek atau gangguan genetik. Hal ini dapat menjadi acuan terhadap pemberian terapi pasien talasemia sesuai dengan manifestasi klinik dan tingkat keparahan pasien talasemia.<sup>28</sup>

Pada era sebelum pemeriksaan DNA dilakukan pemeriksaan genetik dalam pendekatan diagnosis berbasis molekuler sudah mulai digunakan yaitu dengan menganalisis sintesis rantai globin untuk mengetahui tingkat keparahan pasien. Diagnosis molekuler telah diterapkan untuk kasus talasemia dan hemoglobinopati lainnya. Pada awal perjalanan diagnosis genetik, *PCR-based techniques* digunakan untuk mendiagnosis mutasi gen globin yang belum diketahui. Pemeriksaan ini sangat terbatas dan belum dapat mendeteksi perubahan sekuens genetik secara spesifik.<sup>26</sup>

Pemeriksaan lainnya dalam jumlah besar dapat mengetahui substitusi nukleotida tunggal, insersi maupun delesi yaitu menggunakan Gap-PCR. Pemeriksaan ini belum bisa menemukan *point mutation* dan membutuhkan primer spesifik untuk mendeteksi delesi yang tepat. Pemeriksaan ini dapat digunakan untuk mendiagnosis dan mengetahui defek genetik pada pasien talasemia- $\alpha$ , namun belum efektif untuk mengetahui defek genetik pada talasemia- $\beta$ .<sup>29</sup> Selanjutnya, pemeriksaan DNA *reverse-dot-blot* dapat mendeteksi delesi besar dan lebih spesifik. Sehingga DNA *reverse-dot-blot* dan Gap-PCR dapat digunakan untuk mengetahui delesi gen pada talasemia- $\alpha$ .<sup>30</sup>

Pada pasien talasemia- $\beta$ , *Sanger-sequencing* merupakan metode pemeriksaan

yang sering digunakan. Pemeriksaan ini dapat menggambarkan mutasi titik dengan metode pembeda varian globin. Hal ini dikarenakan talasemia- $\beta$  banyak disebabkan oleh mutasi titik. Sekuens DNA gen HBB pada kromosom 11 lebih sederhana dibandingkan gen HBA yang memungkinkan pemeriksaan dengan teknik yang lebih sederhana untuk menekan biaya pemeriksaan.<sup>25</sup> Penggunaan metode *reverse-dot-blot* dengan mendeteksi enzim terkait streptavidin melalui hibridisasi biotin DNA ke membran oligonukleotida pasien dapat mendeteksi adanya beberapa mutasi genetik PCR spesifikasi alel digunakan oleh populasi di Asia Tenggara dan India untuk dijadikan metode diagnosis berbasis molekuler.<sup>10,11,26</sup>

Pengembangan metode pemeriksaan menghasilkan teknologi yang secara spesifik dapat melihat hasil karakterisasi mutasi dan delesi pada seluruh gen globin dalam satu paralel. Metode yang digunakan adalah *next generation sequencing* (NGS). Pemeriksaan NGS merupakan teknologi terbaru untuk mengidentifikasi mekanisme terjadinya penyakit, pemeriksaan klinis dan perubahan paradigma dalam diagnosis klinis suatu penyakit genetik.<sup>31</sup> Pemeriksaan dapat dilakukan pada seluruh genom, seluruh ekson, atau wilayah spesifik yang ingin diperiksa dari suatu genom.<sup>32</sup>

Platform NGS memiliki fitur teknologi sekuensing paralel secara masif dari suatu molekul DNA yang teramplifikasi secara klonal atau tunggal yang dipisahkan secara spasial dalam sel. Desain ini adalah perubahan paradigma dari *Sanger sequencing* yang didasarkan pada pemisahan elektroforetik dari produk rantai terminasi yang diproduksi dalam reaksi sekuensing individu. Pada NGS, sekuensing dilakukan dengan siklus berulang dari ekstensi nukleotida yang dimediasi oleh enzim polimerase atau dengan siklus ligase oligonukleotida.<sup>33,34</sup> NGS memungkinkan untuk generasi cepat dari ribuan hingga jutaan pasangan basa dari urutan DNA dari seorang pasien dengan hasil yang relatif cepat dan keberhasilan yang tinggi.<sup>35</sup>

Pendekatan diagnosis menggunakan NGS terdapat pada laboratorium genomik lebih spesifik untuk mendeteksi sekuens DNA

yang digunakan untuk mencapai sampai fragmen *breakpoint*.<sup>36</sup> Interaksi kompleks yang melibatkan duplikasi gugus gen globin yang diekspresikan berlebih oleh suatu gen akan berpengaruh pada fenotipe penderita talasemia. Oleh karena itu, NGS digunakan untuk karakterisasi duplikasi *breakpoint* pada penyakit talasemia.<sup>37</sup>

Karakterisasi pada kelainan DNA akibat mutasi atau kelainan genetik lainnya penyebab talasemia dapat divisualisasikan lebih akurat dan efisien menggunakan pemeriksaan genetika menggunakan teknologi yang ada. Hal ini dapat membantu dalam penegakkan diagnosis talasemia sesuai dengan fenotipe yang tervisualisasi. Dengan penegakkan diagnosis berbasis molekuler ini didapatkan manifestasi klinis dan tingkat keparahan pasien sehingga pemberian tatalaksana dapat lebih efektif serta meningkatnya kualitas hidup pada penderita talasemia.<sup>37, 38</sup>

### Ringkasan

Talasemia merupakan kelaian darah merah genetik yang diturunkan secara resesif autosom. Talasemia disebabkan oleh defek atau gangguan genetik pada gen rantai globin (rantai  $\alpha$  dan  $\beta$ ) sehingga hemoglobin tidak terbentuk sempurna dan menimbulkan manifestasi klinis berupa anemia, pucat, nyeri, lemah, kelainan pada tulang (*thalassemic facie*) hingga ikterus dan hepatosplenomegali. Perbedaan varian hemoglobin yang mengalami defek menyebabkan perbedaan manifestasi klinis yang berimplikasi kepada tingkat keparahan dan pemberian terapi efektif.

Diagnosis talasemia dapat menggunakan pendekatan berbasis pemeriksaan protein dan molekuler. Pemeriksaan pertama yang harus dilakukan dengan pemeriksaan darah lengkap (eritrosit, Hb, Ht, MCV, MCH) dan pemeriksaan darah samar. Pendekatan diagnosis berbasis pemeriksaan protein mudah dilakukan dan murah namun belum mampu mendeteksi defek genetik yang terjadi pada pasien.

Pemeriksaan genetik dalam pendekatan diagnosis berbasis molekuler sudah dapat memberikan hasil perbedaan varian

hemoglobin yang mengalami defek. Hal ini berguna untuk menilai tingkat keparahan dan pemberian terapi yang efektif pada pasien talasemia. Metode yang digunakan pada diagnosis molekuler sangat beragam dan mempunyai keuntungan dan kelebihan yang berbeda. Pengembangan pemeriksaan genetik dilakukan untuk mendapatkan hasil yang spesifik sehingga dapat menggambarkan defek genetik berupa delesi maupun mutasi. Pemeriksaan genetik dalam pendekatan diagnosis berbasis molekuler dapat memberikan gambaran manifestasi klinis dan penilaian tingkat keparahan penderita sehingga pemberian tatalaksana yang lebih efektif dan peningkatan kualitas hidup pada pasien talasemia akan semakin baik.

### Simpulan

Pemeriksaan genetik dalam pendekatan diagnosis berbasis molekuler dapat digunakan untuk mengetahui gambaran defek atau kelaian genetik (delesi maupun mutase) guna penilaian tingkat keparahan dan manifestasi klinis sehingga pemberian tatalaksana lebih efektif dan peningkatan kualitas hidup pada pasien talasemia.

### Daftar Pustaka

1. Williams TN, Weatherall DJ. World distribution, population genetics, and health burden of the hemoglobinopathies. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(9).
2. Weatherall DJ. The Evolving Spectrum of the Epidemiology of Thalassemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2018;32(2):165–75.
3. Liansyah, Tita Menawati; Herdata HN, Data. Aspek Klinis dan Tatalaksana Talasemia pada Anak. Banda Aceh: J.Ked. N.Med. Vol.1 No.1; 2018.
4. Teti A, Teitelbaum SL. Congenital disorders of bone and blood. *Bone.* 2019;119(2017):71–81.
5. Weatherall DJ. The thalassaemias. *BMJ* 1997; 314: 1675-8.
6. Taher AT, Weatherall DJ, Cappellini MD. Thalassaemia. *Lancet.* 2018;391(10116):155–67.
7. Muncie HL, Campbell JS. Alpha and beta

- thalassemia. *Am Fam Physician*. 2009;80(4).
8. Cappellini MD, Cohen A, Eleftheriou A, et al. Guidelines for the clinical management of thalassaemia. 2<sup>nd</sup> revision edition. Nicosia (Cyprus): Thalassaemia International Federation; 2008
  9. Giordano PC. Strategies for basic laboratory diagnostics of the hemoglobinopathies in multi-ethnic societies: Interpretation of results and pitfalls. *Int J Lab Hematol*. 2013;35(5):465–79.
  10. Brancaloni V, Di Pierro E, Motta I, Cappellini MD. Laboratory diagnosis of thalassemia. *Int J Lab Hematol*. 2016;38:32–40.
  11. Rund D. Thalassemia 2016: Modern medicine battles an ancient disease. *Am J Hematol*. 2016;91(1):15–21.
  12. Welch J. Diagnosis and management of thalassaemia. *Paediatr Child Heal (United Kingdom)*. 2015;25(8):360–7.
  13. Martin A, Thompson AA. Thalassemias. *Pediatric of North America*. 2013; 60: 1383-1391
  14. Danjou F, Francavilla M, Anni F, Satta S, Demartis FR, Perseu L, et al. A genetic score for the prediction of beta-thalassemia severity. *Haematologica*. 2015;100(4):452–7.
  15. Sarnaik SA. Thalassemia and related hemoglobinopathies. *Indian J Pediatr*. 2005; 72:319
  16. Fibach E, Rachmilewitz EA. Pathophysiology and treatment of patients with beta-thalassemia – an update [version 1; referees: 2 approved] *F1000Research* 2017, (F1000 Faculty Rev):2156
  17. Fibach E, Dana M. Oxidative Stress in  $\beta$ -Thalassemia. *Mol Diagnosis Ther*. 2019;23(2):245–61.
  18. Butthep P, Wisedpanichkij R, Jindadamrongwech S, Fucharoen S. Elevated erythropoietin and cytokines levels are related to impaired reticulocyte maturation in thalassaemic patients. *Blood Cells, Mol Dis*. 2015;54(2):170–6.
  19. Gupta R, Musallam KM, Taher AT, Rivella S. Ineffective erythropoiesis: anemia and iron overload. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2018;32(2):213–21.
  20. Oikonomidou PR, Rivella S. What can we learn from ineffective erythropoiesis in thalassemia? *Blood Rev*. 2018;32(2):130–43.
  21. Taher AT, Saliba AN. Iron overload in thalassemia: Different organs at different rates. *Hematology*. 2017;2017(1):265–71.
  22. Fibach E, Rachmilewitz EA. Iron overload in hematological disorders. *Press Med*. 2017; 46: e296-e305
  23. Piel FB, Weatherall DJ. The  $\alpha$ -Thalassemias. *N Engl J Med*. 2014;371(20):1908–16.
  24. Mettananda S, Higgs DR. Molecular Basis and Genetic Modifiers of Thalassemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2018;32(2):177–91.
  25. Thein SL. The molecular basis of  $\beta$ -thalassemia. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(5).
  26. Sabath DE. Molecular diagnosis of thalassemias and hemoglobinopathies: An ACLPS critical review. *Am J Clin Pathol*. 2017;148(1):6–15.
  27. Viprakit V, Ekwattanakit S. Clinical Classification, Screening and Diagnosis for Thalassemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2018;32(2):193–211.
  28. Shang X, Xu X. Update in the genetics of thalassemia: What clinicians need to know. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2017;39:3–15.
  29. Basha B, Mularo F, Cook JR. Design, Validation, and Clinical Implementation of a Gap-Polymerase Chain Reaction Method for  $\alpha$ -Thalassemia Genotyping Using Capillary Electrophoresis. *Hemoglobin*. 2017;41(2):124–30.
  30. Yang Y, Li DZ. Detection of uncommon deletions in alpha-thalassemia using the PCR-reverse dot-blot method for prenatal diagnosis of nondeletional hemoglobin H disease. *Acta Haematol*. 2010;124(1):9–12.
  31. Xue Y, Ankala A, Wilcox WR, Hegde MR. Solving the molecular diagnostic testing conundrum for Mendelian disorders in the era of next-generation sequencing:

- Single-gene, gene panel, or exome/genome sequencing. *Genet Med.* 2015;17(6):444–51.
32. Risoluti R, Materazzi S, Sorrentino F, Bozzi C, Caprari P. Update on thalassemia diagnosis: New insights and methods. *Talanta.* 2018;183:216–22.
  33. Voelkerding K V., Dames SA, Durtschi JD. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem.* 2009;55(4):641–58.
  34. Levy SE, Myers RM. Advancements in Next-Generation Sequencing. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2016;17(1):95–115.
  35. Matthijs G, Souche E, Alders M, Corveleyn A, Eck S, Feenstra I, et al. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. *Eur J Hum Genet.* 2016;24(1):2–5.
  36. Clark BE, Shooter C, Smith F, Brawand D, Thein SL. Next-generation sequencing as a tool for breakpoint analysis in rearrangements of the globin gene clusters. *Int J Lab Hematol.* 2017;39(March):111–20.
  37. Hartevelde, CL. Diagnosis of haemoglobinopathies: New scientific advances. *Thalassemia Reports,* 8(1).
  38. Taher AT, Musallam KM, Karimi M, et al. Overview on practices in thalassemia intermedia management aiming for lowering complication rates across a region of endemicity: the OPTIMAL CARE study. *Blood* 2010;115(10):1886–92