

# RASTREIO NEONATAL DE HEMOGLOBINOPATIAS NUMA POPULAÇÃO RESIDENTE EM PORTUGAL

M. J. PERES, M. H. CARREIRO, M. C. MACHADO, T. SEIXAS, I. PICANÇO, L. BATALHA,  
J. LAVINHA, M. C. MARTINS

Departamento de Genética e Biologia Médica, Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge,  
Serviço de Pediatria, Maternidade Alfredo da Costa, Lisboa.

## RESUMO

O principal objectivo de um rastreio neonatal de hemoglobinopatias é a identificação de recém-nascidos com drepanocitose, os quais estão associados a um síndrome clínico grave. O rastreio possibilitará ainda a identificação de outras hemoglobinopatias, a detecção de portadores, e o posterior rastreio e aconselhamento das famílias. Realizámos um estudo piloto de rastreio neonatal em 400 recém-nascidos em uma maternidade da região de Lisboa. Não foi identificado nenhum recém-nascido com drepanocitose. Seis amostras foram identificadas como sendo de portadores de Hb S, cujas famílias foram estudadas e informadas. Foi efectuado um estudo da incidência da  $\alpha$ -talassémia pela presença da Hb Bart's, diminuição dos índices hematimétricos e caracterização do genótipo  $\alpha$ -globina. Foram identificados 10% de portadores de  $\alpha$ -talassémia ( $-\alpha$ ) e 4% de portadores da triplicação dos genes  $\alpha$ -globina. Discute-se a aplicabilidade de um rastreio de hemoglobinopatias numa população autóctone associada a uma baixa prevalência de Hb S e na comunidade imigrada de língua portuguesa, com uma prevalência elevada de portadores de Hb S.

## SUMMARY

### Neonatal Screening of Hemoglobinopathies in a Population Resident in Portugal

The primary objective of newborn screening of hemoglobinopathies is the early identification of infants with sickle cell disease, as they are at increased clinical risk. Other goals include the identification of other types of clinically significant hemoglobinopathies and the detection of heterozygous carriers followed by the screening and counselling of family members. We performed a pilot study for the neonatal screening of hemoglobinopathies in 400 samples of cord blood taken from a maternity in Lisbon. We did not find any newborn with sickle cell disease. Six samples were from sickle cell heterozygotes, the respective families were studied and informed. We looked for the presence of  $\alpha$ -thalassemia at birth in 100 consecutive samples of cord blood, by the presence of Hb Bart's, abnormal red blood cell indices and  $\alpha$ -globin genotype. The results show an incidence of 10% of  $\alpha$ -thalassemia ( $-\alpha$ ) carriers and 4% of triple  $\alpha$ -globin gene carriers. The authors discuss the feasibility of neonatal screening of hemoglobinopathies in a Portuguese-speaking population consisting of a low prevalence of Hb S trait autochthonous group and a high prevalence immigrant minority.

## INTRODUÇÃO

O rastreio neonatal de hemoglobinopatias é uma estratégia de controlo e prevenção dos síndromas drepanocíticos, extremamente importante em populações onde a drepanocitose e  $\beta$ -talassémia *major* atingem uma elevada prevalência<sup>1,2</sup>.

A realização destes rastreios tem como objectivo principal a identificação precoce das crianças com drepanocitose as quais estão associadas a uma elevada taxa de morbidade e mortalidade nos primeiros cinco anos de vida<sup>3</sup>, devido em particular, às infecções (especialmente pneumocócicas)<sup>4</sup> e crises de sequestração esplénica aguda<sup>5</sup>.

A drepanocitose geralmente não é aparente antes dos três meses de idade e os primeiros sinais são esplenomegalia, anemia, dactilite ou uma complicação, habitualmente uma infecção bacteriana grave (meningite e/ou septicémia) ou sequestração esplénica aguda. No entanto, o início dos sinais e sintomas da doença ou das complicações não são totalmente específicos e, muitas vezes, são de aparência falsamente inócua, daí a importância do seu rastreio precoce<sup>6</sup>.

O diagnóstico neonatal dos síndromas drepanocíticos (SS, SC, SD e S $\beta^0$ tal) permitirá a integração do doente num sistema de cuidados de saúde que garanta o tratamento adequado, quer pela profilaxia das infecções graves (antibioterapia preventiva e vacinação) quer pela educação dos pais, no sentido de reconhecerem os primeiros sinais e sintomas das complicações graves<sup>1,7</sup>.

A identificação precoce de outras hemoglobinopatias *major*, nomeadamente a  $\beta$ -talassémia( $\beta^0$ tal/ $\beta^0$ tal), não se traduz por grandes benefícios para a saúde pública, uma vez que uma intervenção pré-sintomática não conduz à melhoria da qualidade de vida ou ao aumento da sua sobrevivência<sup>1,8</sup>.

O rastreio neonatal possibilitará também a identificação de portadores e a detecção de casais em risco, pelo estudo retrospectivo das famílias dos recém-nascidos afectados, às quais será dado aconselhamento genético não directivo, possibilitando decisões informadas em ulteriores gravidezes.

Em Portugal, são conhecidas as prevalências dos portadores de  $\beta$ -talassémia e Hb S na população autóctone<sup>9</sup>, não ultrapassando a última os 1.1%, nos distritos do sul do país, com bolsas de portadores (com taxas de prevalência da ordem dos 5%), em particular nos concelhos de Alcácer do Sal e Coruche<sup>10</sup>. Na comunidade caboverdeana, foi encontrada uma incidência de 7% de portadores de Hb S<sup>11</sup>. No Ficheiro Nacional de Drepanocitose encontram-se referenciados 218 doentes com síndromas drepanocíticos, dos quais mais de 60% são de origem africana<sup>12</sup>.

Com base nesta realidade, desenvolveu-se um estudo piloto de rastreio neonatal, em 400 recém-nascidos de uma maternidade de Lisboa (Maternidade Dr. Alfredo da Costa-MAC), sem prévia selecção, para avaliar a aplicabilidade deste tipo de rastreio, como estratégia de controlo da drepanocitose, numa população com as características da nossa. Os doentes identificados seriam enviados para uma consulta de pediatria na MAC, no

sentido de prosseguir a sua caracterização clínica e aplicar as medidas preventivas preconizadas.

Por outro lado, dada a expressão da  $\alpha$ -talassémia ao nascimento se caracterizar pela elevação da Hb Bart's<sup>13</sup> e diminuição dos índices hematimétricos (HGM<30pg e VGM<94fl)<sup>14</sup>, pensou-se em utilizar este rastreio para o diagnóstico desta hemoglobinopatia, com o objectivo de evitar despesas futuras no esclarecimento de uma anemia moderada ou em ineficazes ou mesmo iatrogénicas terapêuticas com ferro. Não sendo conhecidos dados epidemiológicos de  $\alpha$ -talassémia na nossa população, aproveitámos, ao mesmo tempo, para fazer um estudo da sua incidência em 100 amostras consecutivas, pela determinação do genótipo  $\alpha$ -globina, em paralelo com a determinação dos índices hematimétricos e da Hb Bart's.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostra populacional:

Em 400 recém-nascidos na MAC, foi colhido sangue do cordão umbilical em EDTA, independentemente de qualquer selecção e com consentimento prévio da mãe. A origem geográfica dos recém-nascidos, estabelecida pela proveniência dos pais, foi de 357 caucasianos, oriundos da região metropolitana de Lisboa e distritos ao sul do rio Tejo; 37 africanos; 5 indianos e 1 desconhecido.

### Análises hematológicas e bioquímicas:

Os índices hematimétricos (HGM e VGM) foram obtidos em contador automático, Coulter S<sub>8/90</sub>, regularmente calibrado e diariamente controlado. Foram utilizadas como técnicas de rastreio, a electroforese das hemoglobinas em acetato de celulose (Titan III-H, Helena Laboratories) em tampão TEB, pH 8.4<sup>15</sup> e focagem isoeléctrica em gel de poliácridamida pH 6-9<sup>16</sup>. O perfil de composição em hemoglobinas de cada recém-nascido foi obtido por comparação com sangue padrão (AFSC, Helena Laboratories). A electroforese em citrato agar, pH 6.0-6.2<sup>15</sup>, foi realizada em todas as amostras que revelaram uma banda de hemoglobina migrando na região da Hb S, pelos métodos anteriores.

A quantificação da Hb Bart's foi efectuada por microcromatografia em coluna de carboximetilcelulose<sup>17</sup> em 100 amostras de sangue do cordão umbilical consecutivas. A exclusão de contaminação com sangue materno foi feita com base na ausência da fracção de Hb A<sub>2</sub> e na avaliação da intensidade relativa das bandas de Hb F e Hb A<sub>1</sub>, sendo predominante, no sangue do recém-nascido normal, a Hb F<sup>1</sup>.

### Análise do DNA:

Em 100 amostras consecutivas de sangue do cordão umbilical isolou-se o DNA a partir dos glóbulos brancos<sup>18,19</sup>, o qual foi digerido com as enzimas de restrição *Bgl* II e *Bam* HI, de acordo com as condições recomendadas pelo fabricante. O estudo do agrupamento génico da  $\alpha$ -globina foi efectuada por Southern blotting<sup>20,21</sup>, usando as sondas específicas para o gene  $\alpha$  e  $\zeta$  globina, marcadas com [<sup>32</sup>P] dCTP por extensão com iniciador aleatório<sup>22</sup>, sendo o resultado obtido visualizado por autorradiografia.

**RESULTADOS**

Todas as amostras revelaram as fracções correspondentes à HbF (Hb F e Hb F acetilada na focagem isoelectrica) e Hb A<sub>1</sub>, o que exclui a presença de homocigotos para a Hb S ou para outra hemoglobina *major*, com a ressalva para a homocigotia β<sup>+</sup>talassémica que, no período neonatal e com a metodologia usada, não é possível identificar ou excluir.

Das 400 amostras de sangue do cordão, seis (1,5%) revelaram uma banda que migra na região da Hb S, a qual foi confirmada por electroforese em citrato agar, pH 6.0-6.2, como sendo Hb S, o que permitiu definir esses recém-nascidos como portadores de Hb S. No *Quadro 1* apresentam-se os resultados do rastreio em função da sua origem geográfica, sendo 4 dos 6 portadores de hemoglobina S, de proveniência africana.

*Quadro 1* – Fenótipo de composição em hemoglobina de 400 recém nascidos de acordo com a sua origem geográfica

Fenótipo	ORIGEM GEOGRAFICA			
	Caucasiana	Africana	Indiana	Desconhecida
AA	355	33	5	1
AS	2	4	0	0

Estes recém-nascidos foram posteriormente reconvocados com o objectivo de confirmar os resultados, tendo sido utilizadas as metodologias referidas anteriormente.

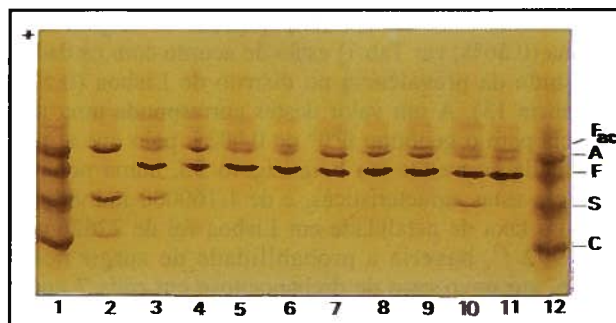
Efectuou-se o estudo familiar aos pais e irmãos dos casos positivos (14 indivíduos) e todos os portadores de AS (7) foram informados da sua situação de portador e respectivas implicações.

Pela comparação dos perfis electroforéticos obtidos em acetato celulose a pH alcalino e na focagem isoelectrica, verificou-se que a última possui um maior poder de resolução, permitindo uma melhor separação das diferentes fracções da hemoglobina, da Hb S e em particular da Hb F da Hb A<sub>1</sub>, o que é extremamente importante na caracterização do estado de homocigotia ou heterocigotia (*Fig. 1*).

Os resultados do estudo da incidência da α-talassémia pela caracterização do genótipo α-globina são apresentados no *Quadro 2*. Dos 10 portadores da deleção de um gene α-globina, dois com a deleção -α<sup>3.7</sup> eram de origem africana, num total de 9 recém-nascidos dessa proveniência. A incidência da α-talassémia nos recém-nascidos caucasianos será de 7.7%.

*Quadro 3* – Índices hematimétricos e Hb Bart's (%) em 100 recém-nascidos em função do genótipo α-globina.

Genótipo	n	VGM (fl)	(média)	HGM (pg)	(média)	Hb Bart's (%)	(média)
αα / αα	86	100-120	(110)	32.7-39.0	(35.8)	0.4-1.1	(0.7)
-α <sup>3.7</sup> / αα	7	95-111	(104)	28.3-38.7	(33.5)	0.8-1.4	(1.1)
-α <sup>4.2</sup> / αα	3	93-110	(101)	27.4-36.2	(31.8)	0.7-1.4	(1.1)
ααα <sup>anti 3.7</sup> / αα	4	100-115	(108)	34.4-37.8	(36.1)	0.3-0.8	(0.6)



*Fig. 1* – Padrão de migração da focagem isoelectrica das hemoglobinas. Canais 1 e 12, sangue padrão AFSC (Helena Laboratores); canal 2, sangue de adulto portador de Hb S (A, S, A<sub>2</sub>); canais 3 e 10, sangue de recém-nascidos portadores de Hb S (F<sub>ac</sub>, A, F e S); canais 4,5,6,7,8,9 e 11, sangue de recém-nascidos normais (F<sub>ac</sub>, A e F)

*Quadro 2* – Epidemiologia molecular do agrupamento génico da globina em 100 amostras consecutivas de sangue do cordão de recém nascidos da MAC.

Genótipo	Incidência	Frequência génica
αα / -α <sup>3.7</sup>	7%	0.035
αα / -α <sup>4.2</sup>	3%	0.015
αα / ααα <sup>anti 3.7</sup>	4%	0.020

No *Quadro 3* apresentam-se os valores médios dos parâmetros hematológicos HGM, VGM e Hb Bart's dos 100 recém-nascidos caracterizados para o genótipo α-globina.

**DISCUSSÃO**

Na década de 70, iniciaram-se os rastreios neonatais sistemáticos nos Estados Unidos e na Jamaica, onde 8 a 10% da população negra é portadora de Hb S<sup>23,24,25</sup>. A redução da taxa de mortalidade e morbidade dos doentes veio justificar, sob o ponto de vista económico e social, a sua execução<sup>7,26</sup>.

A validação de um sistema de rastreio depende de se terem atingido os objectivos principais - identificação precoce de doentes drepanocíticos e aplicação das medidas profiláticas das complicações graves da doença - e posterior análise dos seus efeitos na mortalidade e morbidade desse grupo de doentes. Um balanço positivo, justificaria os custos da implementação em larga escala de um programa deste tipo.

Os resultados obtidos não permitiram identificar nenhum doente e relativamente aos portadores de Hb S

encontrados, os resultados na população de origem caucasiana (0.56%, ver Tab.1) estão de acordo com os dados do estudo da prevalência no distrito de Lisboa (0.5%, referência 13). A um valor destes corresponde uma frequência para o genótipo  $\beta^S\beta^S$  de 0.0025, pelo que a probabilidade de nascer um homocigoto SS, numa população com estas características, é de 1/160000 indivíduos. Como a taxa de natalidade em Lisboa foi de 22826/ano em 1992<sup>27</sup>, haveria a probabilidade de surgir nesta região, um novo caso de drepanocitose em cada 7 anos, pelo que não será estranho o facto de não termos identificado nenhum doente neste rastreio.

No que se refere aos recém-nascidos de origem africana (9.25% da amostra), foram identificados 4 portadores correspondendo a incidência de 10.8% de Hb S neste grupo, o que se situa dentro dos valores observados nos negros americanos<sup>25</sup>, e que levaram à execução destes rastreios. Das mães dos 4 heterocigotos para Hb S identificados, 3 eram naturais de Angola, correspondendo a uma região de África associada a elevadas prevalências desta hemoglobinopatia (11-37% de Hb S, referência 28) daí o termos obtido uma incidência neste grupo superior à da única comunidade negra residente em Portugal estudada, a caboverdeana.

Apesar de se recomendar que o rastreio neonatal deva ser universal, aplicado a todos os recém-nascidos<sup>2,7</sup> é no entanto aceite que quando o número de indivíduos em risco é diminuto, se possam considerar estratégias de rastreios selectivos.

Estudos efectuados no Reino Unido<sup>27</sup> revelaram que populações com menos de 10% de indivíduos de origem africana, o número de casos detectados é tão baixo que estes programas não são reconhecidos como sendo eficazes. Com base nestes dados, pensamos que, numa população como as características da nossa, não parece ser justificável em termos de custo-benefício um rastreio neonatal de drepanocitose, para toda a população.

Fica, no entanto, em aberto a possível aplicação de um rastreio deste tipo dirigido à população em risco, imigrantes dos países africanos de língua oficial portuguesa, tanto mais que estes geralmente não acorrem ao Serviço Nacional de Saúde, escapando assim ao rastreio de portadores que decorre em alguns Centros de Saúde.

No que se refere às metodologias de rastreio para o diagnóstico neonatal da drepanocitose, consideramos ser a focagem isoeléctrica o método de escolha, dada o seu maior poder de resolução, resultante de as hemoglobinas serem separadas de acordo com o seu ponto isoeléctrico num gradiente estável de pH. A utilização da focagem isoeléctrica como método de rastreio, traduz-se por uma diminuição das repetições de análises dada a maior facilidade de interpretação dos perfis de composição em hemoglobinas, o que poderá abonar em favor da sua utilização numa perspectiva de custo-benefício.

Em relação à  $\alpha$ -talassémia delecional os resultados obtidos (10% de portadores; 7.7% de origem caucasiana), com predomínio para a delecção de 3.7kb, enquadram-se dentro dos valores observados na região mediterrânica (5-20%, referência 30) onde grassou até há poucas décadas o paludismo. O facto de se terem encon-

trado três recém-nascidos com a delecção de 4.2kb, o que é elevado, deverá ser confirmado numa amostra maior, dado tratar-se de uma delecção mais frequente na Ásia<sup>31</sup>.

A presença de uma incidência relativamente elevada de  $\alpha$ -talassémia ( $-\alpha$ ), não põe qualquer problema de ordem clínica ou mesmo de prevenção de hemoglobinopatias major, pois da sua interacção só pode resultar um quadro de portador assintomático de  $\alpha$ -talassémia ( $-\alpha/\alpha$ ).

O rastreio neonatal de  $\alpha$ -talassémia com base na diminuição dos índices hematimétricos e presença de Hb Bart's, numa população como a nossa, associada ao predomínio da delecção de um gene  $\alpha$ -globina, ocasionará um grande número de falsos negativos, dada a sobreposição desses parâmetros entre alguns dos recém-nascidos portadores e aqueles com um genótipo  $\alpha$ -globina normal (4 genes  $\alpha$ ). Estes resultados estão de acordo com o já anteriormente referido<sup>32,33</sup>, considerando que a correcta caracterização da  $\alpha$ -talassémia só é possível por caracterização do genótipo  $\alpha$ -globina.

## BIBLIOGRAFIA

1. ICSH: Recommendations for neonatal screening for haemoglobinopathies. *Clin Lab Haemat* 1988;10:335-45.
2. WHO: The haemoglobinopathies in Europe. Combined report on two WHO meetings. 1988.
3. SERJEANT GR, GRANDISON Y, LOWRIE Y: The development of haematological changes in homozygous sickle cell disease: A cohort study from birth to 6 years. *Br Med J* 1981;48:533-43.
4. JOHN AB, RAMLAL A, JACKSON H, MAUDE GH, SHARMA AW, SERJEANT GR: Prevention of pneumococcal infection in children with homozygous sickle cell disease. *Br Med J* 1984;288:1567-70.
5. EDMOND AM, COLLINS R, DARVILLE D, HIGGS DR, MAUDE GH, SERJEANT GR: Acute splenic sequestration in homozygous sickle cell disease: natural history and management. *J Pediatr* 1985;107:201-6.
6. LOBEL JS, CAMERON B, JOHNSON E, SMITH D, KALINAYK K: Value of screening umbilical cord blood for hemoglobinopathy. *Pediatrics* 1989;83(Suppl 5, Pt 2):823-6.
7. CONSENSUS CONFERENCE: Newborn screening for sickle cell disease and other hemoglobinopathies. *JAMA* 1987;258:1205-9.
8. POWARS, D. Diagnosis at birth improves survival of children with sickle cell anemia. *Pediatrics* 1989;83(Suppl 5, Pt 2):830-3.
9. MARTINS MC, OLIM G, MELO J, MAGALHÃES HA, RODRIGUES MO: Hereditary anaemias in Portugal: epidemiology, public health significance and control. *J Med Genet* 1993;30:235-9.
10. MONTEIRO C, RUEFF J, FALCÃO AB, PORTUGAL S, WEATHARALL DJ, KULOZIC AE: The frequency and origin of sickle cell mutation in the district of Coruche/Portugal. *Hum Genet* 1989;82:255-9.
11. MARTINS MC, RODRIGUES MO, PALMA MM: Rastreio para hemoglobinopatias e deficiência em G6PD na comunidade caboverdeana residente em Lisboa- primeiros resultados (resumo). Simpósio sobre Drepanocitose. Lisboa, 1988.
12. MARTINS MC, GOMES MA: Acção concertada a nível da CEE para o desenvolvimento de métodos de avaliação e melhoria de serviços no que se refere a hemoglobinopatias (resumo). 4º Simpósio - Hemoglobinopatias em Portugal: do rastreio à prevenção. Beja, 1993.
13. LIE-INJO LG, SOLAI A, HERRERA AR, NICOLAISEN L, KAN YW, WAN WP, HASAN K: Hb Bart's levels in cord blood and deletions of  $\alpha$ -globin genes. *Blood* 1982;59:370-3.
14. HALL FW, LUNDGRIN DB: Screening for alpha thalassemia in neonates, routine erythrocyte measurements. *Am J Clin Pathol* 1987; 87;3:389-91.
15. CDC: Laboratory Methods for detecting hemoglobinopathies. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta 1984:45-58.
16. BASSET P, BEUZARD Y, GAREL MC, ROSA J: Isoelectric focusing of human hemoglobins: its application to screening to the characterization of 70 variants and to the study of modified fraction of normal hemoglobins. *Blood* 1978;51;5:971-82.
17. HENSO JB, CARVER JR, WILSON JB, HUISMAN THJ: Carboxymethyl cellulose microchromatography for the quantitation of

hemoglobin Bart's ( $\gamma_4$ ) and its use in the detection of  $\alpha$ -thalassemia conditions. *J of Chromat* 1980,198:443-48.

18. GROSS-BELLARD DM, OUDET P, CHAMBON P: Isolation of high molecular weight DNA from mammalian cells. *Eur J Biochem* 1976, 36:32-38.

19. MILLER SA, DYKES DD, POLENSKY HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988,16:1215.

20. SOUTHERN EM: Detection of specific fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975,98:503-17.

21. REED KC, MANN DA: Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucleic Acids Res* 1985,13:7207-21.

22. FEINEBERG AP, VOGELSTEIN B: A technique for radiolabeling DNA restriction endonucleases fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983,132:6-13.

23. PEARSON HA, O'BRIEN RT, McINTOSH S, ASPNES GT, YANG M-N: Routine screening of umbilical cord bloods for detection of sickle cell disease. *JAMA* 1974;227:420-1.

24. SERJEANT BE, FORBES M, WILLIAMS LL, SERJEANT GR: Screening cord bloods for detection of sickle cell disease in Jamaica. *Clin Chem* 1974,20:666-9.

25. OHENE-FREMPONG K: Selected testing for sickle cell disease. *Pediatrics* 1989;83 (Supp 5, Pt 2):879-80.

26. ECKMAN JR: Neonatal Screening. In Embury SH, Hebbel RP, Mohandas N, Steinberg MH, ed. Sickle cell disease: basic principles and clinical practice. Raven Press, Ltd., New York, 1994:509-15.

27. DIREÇÃO GERAL DE SAÚDE: Natalidade, mortalidade infantil e mortalidade perinatal (1988/1992). 1993.

28. SERJEANT GR: Sickle cell disease. Oxford Medical Publications, 1985:20.

29. GRIFLITHS KD, RAINE DN, MANN JR: Neonatal screening for sickle haemoglobinopathies in Birmingham. *Br Med J* 1982,284:933-5.

30. WHO: Report of the annual meeting of the WHO Working Group on the feasibility study on hereditary disease community control programs (Hereditary Anemias: Alpha Thalassemias). Creta, 1987.

31. LIEBHABER SA:  $\alpha$ -thalassemia. *Hemoglobin* 1989,13,7&8:685-32.

32. TRENT R, BROCK PE, YAKAS J, TRENT LM, KRONENBERG H: Diagnosis of  $\alpha$ -thalassemia in the newborn. Cord blood survey utilizing gene mapping. *Pathology* 1984,16:16-21.

33. KANAVAKIS E, TZOSTZOS S, LIAPAKI A, METAXITOU-MAUROMATIA A, KATTAMIS C: Frequency of  $\alpha$ -thalassemia in Grece. *Am J Hematol* 1986, 22,3:225-32.