

ĐÁNH GIÁ DNA MICROARRAY PHÁT HIỆN ĐỒNG THỜI 24 ĐỘT BIẾN α VÀ β - THALASSEMIA PHỔ BIẾN TẠI VIỆT NAM

Bạch Quốc Khánh¹, Dương Quốc Chính¹, Nguyễn Thị Thanh Tâm^{2*},
Nguyễn Văn Khiêm², Vũ Thị Thơm², Phạm Thu Hằng²,
Phạm Thị Nhung², Trần Duy Hưng², Trịnh Thị Mỹ Uyên²,
Nguyễn Thị Hằng², Huỳnh Nguyên Bửu Châu²

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Phương pháp phát hiện đồng thời các đột biến gen α và β thalassemia là cần thiết trong các chương trình ngăn ngừa và kiểm soát bệnh thalassemia.

Phương pháp: Chúng tôi đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu lâm sàng và khả năng ứng dụng của DNA microarray với tên thương mại “BIMEDCHIP® Thalassemia Detection Kit” cho phép phát hiện đồng thời 24 đột biến gen α và β - thalassemia phổ biến tại Việt Nam. Tổng 470 mẫu bệnh phẩm gDNA gồm 270 mẫu gDNA dương tính thalassemia đại diện cho 24 đột biến thalassemia khác nhau, 100 mẫu gDNA âm tính với thalassemia và 100 mẫu nghi ngờ mang gen đột biến gây bệnh thalassemia được xét nghiệm đồng thời bằng DNA microarray và các xét nghiệm khẳng định đang dùng tại Khoa Di truyền – Sinh học phân tử (Viện Huyết học Truyền máu Trung ương).

Kết quả: Tổng 465 mẫu bệnh phẩm gDNA (99%, 465/470) có kết quả trùng khớp giữa DNA microarray và xét nghiệm khẳng định, và sự khác biệt quan sát được ở 5 mẫu gDNA (3 mẫu âm

tính giả và 2 mẫu dương tính giả) chủ yếu liên quan đến các đột biến hiếm như -90, -88, CD8/9 và Int CD.

Kết luận: DNA microarray là một phương pháp nhanh, dễ sử dụng, chính xác và hiệu quả về mặt chi phí để xác định đồng thời các đột biến α và β thalassemia phổ biến tại Việt Nam.

Từ khóa: DNA microarray, thalassemia, đột biến gen, alpha-globin, beta-globin

SUMMARY

VALIDATION OF A DNA MICROARRAY FOR SIMULTANEOUS DETECTION OF COMMON α AND β -THALASSEMIA MUTATIONS IN VIETNAM

Introduction: A reliable method for the simultaneous detection of α and β -thalassemia gene mutations is critical for prevention and control of thalassemia in Vietnam.

Methods: We determined clinical sensitivity and clinical specificity of a DNA microarray diagnostic kit with the commercial name “BIMEDCHIP® Thalassemia Detection Kit”. The kit is capable of simultaneously detecting 24 common α and β -thalassemia gene mutations in Vietnam. The study was performed on 470 samples, including 270 thalassemia positive samples, 100 thalassemia negative samples and 100 blind samples. The diagnostic results by the DNA microarray kit were compared with the results obtained from standardized methods that

¹Viện Huyết học Truyền máu Trung ương

²Công ty TNHH MTV Nhà máy công nghệ sinh học và thiết bị y tế (BIMEDTECH)

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Thị Thanh Tâm
Email: tam.nguyen@bimedtech.com

Ngày nhận bài: 08/4/2021

Ngày phản biện khoa học: 08/4/2021

Ngày duyệt bài: 19/4/2021

are currently used in Genetics and Molecular Biology Department (National Institute of Hematology and Blood Transfusion).

Results: The results for 465 samples (99%, 465/470) were completely concordant between the DNA microarray and standardized methods. Discrepancies were observed in 5 samples with 2 false positive results and 3 false negative results for rare mutations such as -90, -88, CD8/9 and Int CD.

Conclusions: DNA microarray is a rapid, easy to use, accurate and cost-effective method to simultaneously detect the most common α and β thalassemia mutations in Vietnam. The sensitivity and specificity of this technique to detect rare mutations need to be improved before routine laboratory use.

Key word: DNA microarray, thalassemia, gene mutations, alpha-globin, beta-globin.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thalassemia và bệnh hemoglobin là các rối loạn di truyền do sự sản xuất các Hb bất thường về cấu trúc hoặc giảm sự tổng hợp của của các Hb bình thường về cấu trúc hình thành bệnh lý hồng cầu [1]. Alpha thalassemia, beta thalassemia và HbE phổ biến tại Việt Nam nhưng các biến thể phụ thuộc vào từng dân tộc [2]. Tỷ lệ mang gen Thalassemia và bệnh huyết sắc tố của một số dân tộc thiểu số ở miền núi phía Bắc (Việt Nam) là 24,1%. Tỷ lệ người mang gen alpha thalassemia, beta thalassemia và HbE lần lượt là 15,7%, 5,4% và 6,7%, phối hợp alpha thalassemia và beta thalassemia là 3,2%. Tỷ lệ mang gen thalassemia và bệnh huyết sắc tố trong cộng đồng các dân tộc thiểu số miền núi phía Bắc là khá cao, tỷ lệ các kiểu đột biến có khác nhau giữa các dân tộc. 7 kiểu đột biến trên gen α -globin, đột biến SEA chiếm tỷ lệ cao nhất là 46,4%, đột biến α^+ -

thal gồm 3,7, 4,2 và HbCS chiếm tỷ lệ 35,2%, 10,9% và 6,4%. Có 8 đột biến trên gen β -globin, đột biến Cd17 chiếm 41,8%, đột biến Cd41/42 chiếm 32,3%, đột biến Cd71/72 chiếm 12,6%, đột biến -28 là 9,96% trong các đột biến β -thal [3]. Như vậy tỷ lệ mang gen bệnh thalassemia tại Việt Nam là cao và khá đa dạng về kiểu đột biến, phối hợp.

Có 3 dạng thalassemia thể nặng gồm α^0 -thalassemia đồng hợp (hội chứng Hb Bart), β -thalassemia đồng hợp và β -thalassemia-HbE là mục tiêu chính của các chương trình ngăn ngừa và kiểm soát bệnh thalassemia [4]. Để sàng lọc và phát hiện nhanh một khu vực có dân số đông và hạn chế về nguồn lực thì phương pháp sàng lọc sơ bộ thường được sử dụng và các mẫu đáp ứng các tiêu chuẩn chẩn đoán về bệnh thalassemia gồm chỉ số xét nghiệm tế bào máu ngoại vi (MCV < 85 fl và MCH < 28 pg) sẽ được lựa chọn và sàng lọc dương tính bằng việc xác định thành phần huyết sắc tố và phân tích DNA [5]. Những bước này yêu cầu một quy trình phức tạp và mất nhiều thời gian do đó việc phát triển một phương pháp mới cho phép xét nghiệm nhanh và đa mục tiêu là cần thiết. Công ty BIMEDTECH đã nghiên cứu và phát triển sản phẩm DNA microarray với tên thương mại “BIMEDCHIP® Thalassemia Detection Kit” cho phép phát hiện đồng thời 24 đột biến α và β thalassemia biến phổ biến tại Việt Nam. Mục đích chính của nghiên cứu là để đánh giá hiệu quả của DNA microarray này trong chẩn đoán các đột biến α và β thalassemia phổ biến tại Việt Nam.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các mẫu bệnh phẩm DNA được sử dụng để đánh giá chất lượng của DNA microarray

“BIMEDCHIP® Thalassemia Detection Kit” là các mẫu gDNA được thu nhận khi thực hiện Đề tài “*Nghiên cứu tần số phân bố các đa hình gen liên quan đến bệnh thalassemia ở người Việt Nam và thử nghiệm Biochip chẩn đoán bệnh thalassemia*” và lưu trữ tại Viện Huyết học - Truyền máu TW. Các mẫu gDNA này đã được khảo sát các đột biến gen liên quan đến bệnh Thalassemia bằng kỹ thuật multiplex ARMS-PCR, multiplex GAP-PCR, hoặc giải trình tự gen trên hệ thống Sanger/NGS.

2.2. Phương pháp xét nghiệm với DNA microarray

Việc xét nghiệm các mẫu gDNA được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng của sản phẩm qua các bước: PCR vòng 1, PCR vòng 2, lai hóa và đọc kết quả.

PCR vòng 1 được thực hiện với 3 ống PCR mix gồm mix 1 (màu tím), mix 2 (màu vàng), mix 3 (màu xanh da trời), sử dụng khuôn là gDNA với chu trình nhiệt như sau: 95°C/3 phút; 30 chu kỳ gồm 94°C/45 giây, 60°C/45 giây và 72°C/30 giây; 72°C/5 phút; 4°C/∞.

PCR vòng 2 được thực hiện với 3 ống PCR mix gồm mix 5 (màu nâu), mix 6 (màu xanh lục), mix 7 (màu trắng), sử dụng khuôn là sản phẩm PCR vòng 1 với chu trình nhiệt như sau: 95°C/2 phút; 20 chu kỳ gồm 94°C/45 giây, 60°C/45 giây và 72°C/30 giây; 4°C/∞.

Lai hóa và đọc kết quả: Lam kính (DNA microarray) được lắp vào buồng lai để tạo thành các giếng lai, mỗi mẫu DNA sẽ được thực hiện trên 2 giếng lai, mỗi lam kính sẽ xét nghiệm đồng thời được 8 mẫu gDNA. Sản phẩm PCR vòng 2 sẽ được biến tính ở

95°C trong 3 phút và làm lạnh nhanh trong PCR rack chiller ít nhất 1 phút để duy trì trạng thái mạch đơn sẵn sàng cho lai hóa. Chuyển 20 µL sản phẩm PCR đã biến tính vào các giếng lai đã được bổ sung sẵn 60 µL đệm lai hóa HS. Tiến hành lai hóa trong 1 giờ ở 50°C, 250 rpm. Sau lai hóa, các giếng được rửa lần lượt bằng 150 µL dung dịch rửa WS-1 và WS-2 ở 50°C, 250 rpm trong 5 phút. Với mỗi dung dịch rửa sẽ được thực hiện lặp lại 2-3 lần. Sau đó, các giếng được tráng bằng 100 µL dung dịch tráng RS. Để hiển thị kết quả lai hóa, các giếng được nhuộm với dung dịch nhuộm gồm 100 µL dung dịch RS và 0.1 µL dung dịch DS ở nhiệt độ phòng 250 rpm trong 10 phút. Dung dịch nhuộm được loại bỏ và tráng bởi 100 µL dung dịch RS. Tháo lam kính ra khỏi buồng lai và rửa lần lượt với 5-7 mL dung dịch RS và 5-7 mL nước nuclease. Lam kính sau đó được làm khô bằng máy ly tâm lam kính trong 30 giây. Sử dụng máy BimedReader FL2 (thiết bị đọc kết quả chuyên dụng cho Bộ sinh phẩm) để đọc kết quả trên lam kính.

2.3. Phương pháp đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu lâm sàng của DNA microarray

Sử dụng 470 mẫu gDNA trong đó có 270 mẫu dương tính bao phủ 24 loại đột biến gây bệnh Thalassemia mà DNA microarray có khả năng phát hiện (gồm cả đột biến đơn, đột biến phối hợp, đột biến ở dạng dị hợp và dạng đồng hợp, với các đột biến phổ biến tối thiểu 10 mẫu gDNA/đột biến, với các đột biến hiếm thì tối thiểu 1-3 gDNA/đột biến), 100 mẫu âm tính với các đột biến gen gây bệnh Thalassemia và 100 mẫu nghi ngờ

mang gen bệnh (alpha/beta thalassemia). Các mẫu đảm bảo về nồng độ DNA từ 20 – 100 ng/ μ L và độ tinh sạch A260/A280=1,7-2,0. Các mẫu được xác định kiểu gen trước là âm tính hoặc dương tính (dương tính cụ thể đột biến nào) bằng các xét nghiệm khẳng định đang dùng tại Khoa Di truyền – Sinh học phân tử (Viện Huyết học Truyền máu Trung ương) sau đó tiến hành xét nghiệm với DNA microarray và ghi nhận lại kết quả.

III. KẾT QUẢ

DNA microarray “BIMEDCHIP® Thalassemia Detection Kit” có khả năng phát hiện 24 đột biến gen α và β globin gây ra bệnh thalassemia bao gồm các đột biến điểm (Single Nucleotide Variation - SNV) và đột biến mất đoạn. Hai mươi tư đột biến bao gồm: 4 đột biến mất đoạn gen α -globin gồm --SEA, --THAI, - α 4.2, - α 3.7); 5 đột biến điểm gen α -globin gồm Init CD ATG>ACG, Init CD ATG>A-G (c.2delT), CD 142 TAA>CAA - Hb Constant Spring (Hb Cs),

CD 142 TAA>TAT – Hb Paksé, CD 125 (CTG>CCG) – Hb Quang Sze (Hb Qs); và 15 đột biến điểm gen β -globin gồm: -90 C>T, -88 C>T, -28 A>G, CD 8/9 +G, CD 17 AAG>TAG, CD 26 GAG>AAG (Hb E), IVS I-1 G>T, IVS I-5 G>C, CD 35 TAC>TAA, CD 41/42 -CTTT, CD 43 GAG>TAG, CD 71/72 +A, CD 95 +A, IVS II-654 C>T, CD 147 +TC (Hb Tak). Trong tổng số 270 mẫu gDNA dương tính thalassemia được chọn sẽ bao phủ 24 đột biến gen globin mà DNA microarray có khả năng phát hiện.

Trong 270 mẫu dương tính thì DNA microarray xác định được 265 mẫu dương tính trùng khớp với xét nghiệm khẳng định (98%) và có 2 mẫu dương tính phát hiện thêm đột biến khác nằm ngoài các đột biến được xác định bằng xét nghiệm khẳng định (Bảng 1). Do đó 2 mẫu này được xếp vào nhóm mẫu dương tính giả. Đồng thời có 3 mẫu âm tính giả không trả được đột biến đã được xác định bằng xét nghiệm khẳng định (phương pháp chuẩn) (Bảng 1).

Bảng 1: Các mẫu trả kết quả sai lệch giữa DNA microarray và phương pháp xét nghiệm khẳng định (Viện Huyết học – Truyền máu Trung ương)

Mã mẫu	DNA microarray	Phương pháp xét nghiệm khẳng định	Kết luận
D20.965	CD17, Int CD	CD17	Dương tính giả
82733	CD95, HbCs, -90	CD95, Hb Cs	Dương tính giả
D19.2834	CD26	CD8/9, CD 26	Âm tính giả
D19.2836	CD26	CD8/9, CD 26	Âm tính giả
80941	Normal	-88	Âm tính giả

Trong 100 mẫu âm tính thì DNA microarray xác định được 100% mẫu là âm tính.

Trong 100 mẫu chưa xác định (mẫu mù) thì DNA microarray xác định được 78 mẫu dương tính và 22 mẫu âm tính. Kết quả này trùng khớp 100% với xét nghiệm khẳng định.

Như vậy, tổng số mẫu dương tính thật là 265+78=343 (TP). Tổng số mẫu âm tính thật là 100+22=122 (TN). Tổng số mẫu dương tính giả là 2 (FP) và âm tính giả là 3 (FN). Kết quả tổng hợp được thể hiện trong Bảng 2:

Bảng 2: Kết quả xét nghiệm đánh giá độ đặc hiệu và độ nhạy (Bảng 2x2)

Kết quả dùng DNA microarray	Kết quả xét nghiệm khẳng định		Tổng cộng
	Dương tính	Âm tính	
Dương tính (có đột biến gen globin)	343 (TP)	2 (FP)	345 (TP+FP)
Âm tính (không có đột biến gen globin)	3 (FN)	122 (TN)	125 (FN+TN)
Tổng cộng	346 (TP+FN)	124 (FP+TN)	470 (TP+FN+FP+TN)

Ghi chú: 2 mẫu được đánh giá là dương tính giả khi DNA microarray phát hiện thêm một/nhiều đột biến ngoài các đột biến có trong mẫu được xác định bằng xét nghiệm khẳng định.

Với TN=122; FP= 2 (Bảng 2) thì độ đặc hiệu của DNA microarray là 98%. Tính toán khoảng tin cậy 95% CI của độ đặc hiệu được trình bày trong bảng 3. Các phương pháp tính toán khác nhau này cho thấy độ đặc hiệu của DNA microarray trong khoảng từ 95%-100%.

Bảng 3: Kết quả xét nghiệm độ đặc hiệu và 95% CI theo các phương pháp tính toán khác nhau

Độ đặc hiệu	Phương pháp	CI 95%
98%	1. Simple asymptotic, không hiệu chỉnh liên tục Wald	96%- 100%
98%	2. Simple asymptotic, hiệu chỉnh liên tục	95%- 100%
98%	3. Score method, không hiệu chỉnh liên tục Wilson	95%- 99%
98%	4. Score method, hiệu chỉnh liên tục	94%- 99%
98%	5. Binomial-based, 'Exact' Clopper-Pearson	95%- 99%

Với TP=343; FN= 3 (Bảng 2) thì độ nhạy của DNA microarray là 99%. Tính toán khoảng tin cậy 95% CI của độ nhạy được trình bày trong bảng 4. Các phương pháp tính toán khác nhau này cho thấy độ nhạy của DNA microarray trong khoảng từ 97%-100%.

Bảng 4: Kết quả xét nghiệm độ nhạy và 95% CI theo các phương pháp tính toán khác nhau

Độ nhạy	Phương pháp	CI 95%
100%	1. Simple asymptotic, không hiệu chỉnh liên tục Wald	100%-100%
100%	2. Simple asymptotic, hiệu chỉnh liên tục	99%-100%
100%	3. Score method, không hiệu chỉnh liên tục Wilson	97%-100%
100%	4. Score method, hiệu chỉnh liên tục	97%-99%
100%	5. Binomial-based, 'Exact' Clopper-Pearson	97%-100%

Để đánh giá 2 phương pháp xét nghiệm có đồng nhất hoặc tương đồng hay không người ta thường sử dụng hệ số kappa. Hệ số kappa

thu được khi đánh giá sự tương đồng giữa DNA microarray và các phương pháp xét nghiệm khẳng định đang sử dụng tại Khoa di

truyền – Sinh học phân tử là $\kappa = 0.97$ và theo Altman (1991) thì độ tương đồng này là rất tốt. Như vậy DNA microarray là tương đương với các phương pháp đang được sử dụng tại Khoa Di truyền sinh học phân tử, Viện Huyết học – Truyền máu Trung ương để chẩn đoán các đột biến gây bệnh α và β thalassemia. Ngoại trừ một vài khác biệt nhỏ trong phát hiện đột biến Init CD ATG>ACG, -90 C>T, CD8/9, -88 thì không có sự khác biệt nào về kết quả xét nghiệm đột biến khác khi sử dụng sinh phẩm nghiên cứu khi so sánh với các phương pháp chuẩn hiện đang được sử dụng tại cơ sở nghiên cứu.

IV. BÀN LUẬN

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu lâm sàng, và khả năng ứng dụng của DNA microarray cho phép phát hiện đồng thời các kiểu gen α và β thalassemia phổ biến tại Việt Nam. Kết quả phân tích kiểu gen bằng DNA microarray có độ tương đồng cao với các kết quả của các phương pháp tham chiếu chứng tỏ độ tin cậy và khả năng bao phủ toàn diện của DNA microarray. Dựa vào các dữ liệu đã công bố, DNA microarray bao phủ >96% các đột biến gen α và β -globin gây ra bệnh thalassemia tại Việt Nam. DNA microarray đại diện cho một quy trình xét nghiệm đơn lẻ, nhanh và có giá trị so với các phương pháp chẩn đoán nhiều bước. Kỹ thuật này cũng yêu cầu một lượng DNA nhỏ (giới hạn phát hiện >20 ng/ μ L), có tầm quan trọng đặc biệt để sử dụng trong chẩn đoán trước sinh. Tuy nhiên, microarray được thiết kế để phát hiện các đột biến đã biết và không phát hiện được đột biến mới và các đột biến nằm ngoài thiết kế ban đầu.

Các phương pháp lai hóa ngược (reverse hybridization strip assay, reverse dot-blot assay) và oligonucleotide microarray cho phép phân tích đồng thời α và β -thalassemia đã được báo cáo trước đây. Tuy nhiên, không có phương pháp nào có khả năng phát hiện đồng thời các kiểu gen α và β -thalassemia phổ biến tại Việt Nam. Do đó, trong nghiên cứu này, DNA microarray cho phép phát hiện đồng thời các kiểu gen α và β -thalassemia phổ biến tại Việt Nam theo một quy trình đơn giản dựa vào các thiết bị sẵn có bao gồm máy PCR, bể ổn nhiệt và một máy chuyên dụng để phát hiện tín hiệu huỳnh quang một cách tự động.

V. KẾT LUẬN

Thông qua việc đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu lâm sàng tại Viện Huyết học – Truyền máu Trung ương theo đề cương nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng được phê duyệt theo quyết định số 3484/QĐ-BYT và theo chứng nhận chấp thuận của Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học Quốc gia. Quá trình đánh giá thu được kết quả rất khả quan với các chỉ tiêu độ chính xác cao $\geq 95\%$, độ nhạy chẩn đoán và độ đặc hiệu chẩn đoán tương ứng 99% và 98%, kết quả ghi nhận từ BIMEDCHIP® Thalassemia Detection Kit có tính tương đồng cao với phương pháp chẩn đoán thường quy đang sử dụng tại Viện.

Hiệu năng của bộ sinh phẩm BIMEDCHIP® Thalassemia Detection Kit đã đạt các yêu cầu kiểm định của đơn vị độc lập là Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế và đã được cấp giấy chứng nhận kiểm nghiệm trang thiết bị y tế chẩn đoán in vitro số 01021/TTBYT-ĐK, cho thấy

DNA microarray là một phương pháp chẩn đoán đơn giản, nhanh, chính xác và hiệu quả về mặt chi phí để phát hiện đồng thời các kiểu gen α và β -thalassemia phổ biến tại Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN

Công ty TNHH MTV Nhà máy Công nghệ sinh học và Thiết bị Y tế là tổ chức chủ trì đề tài theo quyết định số 4379/QĐ-BCT ngày 3/11/2016 của Bộ Công Thương. Dự án thuộc “Chương trình phát triển một số ngành công nghiệp công nghệ cao” của Bộ Công Thương theo hợp đồng số 01/2017/CNC/HDNCKH ngày 5/5/2017. Dự án được thực hiện với các mục tiêu chính như sau:

1. Làm chủ được công nghệ sản xuất chip sinh học trên nền DNA microarray.
2. Sản xuất được các bộ chip sinh học đạt tiêu chuẩn chất lượng của sinh phẩm

chẩn đoán *in vitro* - IVD (tham khảo tiêu chuẩn quốc tế).

3. Ứng dụng được các bộ chip sinh học là sản phẩm do dự án nghiên cứu sản xuất vào chẩn đoán bệnh trên lâm sàng.

Qua đây, chúng tôi xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ của Viện Huyết học – Truyền máu Trung ương và dự án “Nghiên cứu sản xuất chip sinh học trên nền DNA microarray để chẩn đoán một số bệnh ở người” mã số 01/2017/CNC-HDKHCN đã tài trợ kinh phí cho chúng tôi thực hiện nghiên cứu này và đây cũng là kết quả thành công theo chủ chương phát triển ngành công nghệ cao phối hợp giữa các nhà khoa học với doanh nghiệp để tạo ra những sản phẩm đóng góp một phần nhỏ trong công cuộc chăm sóc sức khỏe nhân dân và nâng cao chất lượng dân số người Việt Nam.



TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Marengo-Rowe, A. J. (2007).** The thalassemias and related disorders. *Proceedings (Baylor University. Medical Center)*, 20(1), 27–31.
2. **Nguyen, H. N. (2015). AB035.** Thalassemia in Vietnam. *Annals of Translational Medicine*, 3(Suppl 2). <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.AB035>
3. **Bạch, Q. K., Nguyễn, T. T. H., Dương, T. C., Ngô, H. M., Ngô, M. Q., Dương, Q. C., ... Nguyễn, A. T. (2019).** Khảo sát tình hình mang gen thalassemia và bệnh huyết sắc tố ở một số dân tộc ít người ở miền núi phía Bắc Việt Nam. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 477, 241–250.
4. **Fucharoen, S., & Winichagoon, P. (1992).** Thalassemia in SouthEast Asia: problems and strategy for prevention and control. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 23(4), 647–655.
5. **Nguyễn, T. N., Nguyễn, T. H., Nguyễn, T. K. L., & Nguyễn, A. T. (2019).** Sơ bộ đánh giá kết quả khám lâm sàng và các xét nghiệm vòng một để sàng lọc bước đầu thalassemia trong cộng đồng. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 477.