

CURSO “ON LINE” DE CRIBADO NEONATAL

1ª edición



**SOCIEDAD ESPAÑOLA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA
Y PATOLOGÍA MOLECULAR**

MODULO III

TEMA 8: CRIBADO NEONATAL DE HEMOGLOBINOPATIAS

RAQUEL YAHYAOUI MACIAS

LABORATORIO DE METABOLOPATIAS

HOSPITAL CARLOS HAYA

AVDA. ARROYO DE LOS ANGELES S/N

29011 MALAGA

951292274

e-mail: raquelyahyaoui@gmail.com

1. INTRODUCCIÓN

La hemoglobina (Hb) es una proteína formada por cuatro cadenas de globina y cuatro grupos hemo. Es el componente mayoritario de los eritrocitos maduros y su función principal es la oxigenación de los tejidos. Un individuo adulto normal posee dos genes β y cuatro genes α que codifican la síntesis de tres fracciones de hemoglobina: hemoglobina A (HbA) formada por dos cadenas α y dos cadenas β ($\alpha_2\beta_2$) y que representa aproximadamente el 96% de la Hb total, hemoglobina A₂ (HbA₂), formada por dos cadenas α y dos cadenas δ ($\alpha_2\delta_2$) y que constituye menos del 2,5% y hemoglobina F o fetal (HbF) formada por dos cadenas α y dos cadenas γ ($\alpha_2\gamma_2$), que representa menos del 1,5% (1,2).

Las hemoglobinopatías son las alteraciones monogénicas más frecuentes y se definen como alteraciones cualitativas o cuantitativas de las cadenas de globina de la hemoglobina. Se encuentran ampliamente distribuidas por toda la geografía mundial, estimándose que aproximadamente el 7% de la población es portadora heterocigota, y que alrededor de 300.000 recién nacidos al año presentan una hemoglobinopatía grave (3).

2. FISIOPATOLOGÍA Y CLÍNICA

Las hemoglobinopatías se clasifican en dos grandes grupos: las hemoglobinopatías estructurales y los síndromes talasémicos.

2.1. Hemoglobinopatías estructurales

Son el resultado de mutaciones a nivel de alguno de los genes que codifican la síntesis de una de las cadenas de globina. Se han descrito más de 800 variantes estructurales de la hemoglobina, de las cuales entre 25 y 30 son clínicamente significativas, y en más del 95% la alteración consiste en la sustitución de un sólo aminoácido. Dependiendo de la naturaleza y localización del aminoácido reemplazado se van a producir cambios en la estabilidad, solubilidad y función de la molécula de la hemoglobina, que son los responsables finales de las manifestaciones clínicas. Las hemoglobinopatías estructurales más frecuentes son la HbS, HbC, HbE y HbD, siendo la HbS la que constituye el 70% de todas las hemoglobinopatías y la que presenta consecuencias clínicas más graves (1-4).

La hemoglobinopatía S, anemia de células falciformes o drepanocitosis es una enfermedad genética autosómica recesiva debida a la sustitución del ácido glutámico por valina en el sexto aminoácido de la cadena β de globina. Esto se traduce en una menor solubilidad de la forma reducida de la Hb produciendo eritrocitos rígidos que no atraviesan los pequeños vasos sanguíneos o lo hacen con dificultad. Los hematíes, en forma de hoz, se adhieren al endotelio vascular y taponan las pequeñas arteriolas y capilares, lo que origina oclusión e infarto. Al ser demasiado frágiles para resistir el traumatismo mecánico de la circulación se produce su hemólisis cuando se introducen en el torrente circulatorio.

Existen varios tipos de drepanocitosis, los más frecuentes son:

- Homocigota o anemia de células falciformes (HbSS)
- Rasgo falciforme, rasgo drepanocítico o estado portador (HbAS)
- Doble heterocigota HbS- β talasemia
- Doble heterocigota HbS-HbC (HbSC)

Otros tipos de drepanocitosis menos frecuentes que presentan gravedad clínica son:

- Doble heterocigota HbS-HbD^{Punjab} (HbSD-Punjab)
- Doble heterocigota HbS-O^{Arab} (HbSO-Arab)

Por último, existen otras variables con afectación clínica leve o moderada:

Doble heterocigota HbS- HbE (HbSE) y HbS-HbX (HbSX)

Generalmente, sólo se producen manifestaciones clínicas en el estado homocigoto o doble heterocigoto. Estas suelen comenzar a los 4-6 meses de vida y se deben tanto a la anemia hemolítica como a las crisis vasooclusivas. Las crisis vasooclusivas se caracterizan por infarto tisular, a menudo acompañados por dolor y pueden afectar a casi todos los órganos o tejidos, especialmente el hueso, el pulmón, el bazo, el hígado y el cerebro.

Los sujetos afectados presentan una mayor susceptibilidad a las infecciones (7-8%) (5), siendo la sepsis por *S. pneumoniae* y *H. influenzae* las principales responsables de la morbi-mortalidad entre el 1º y 3º año de vida (6), siendo las infecciones más comunes las del aparato respiratorio y la septicemia. En niños, el crecimiento y desarrollo suele estar afectado pudiendo dar lugar a alteraciones óseas secundarias a infartos en médula

ósea y hueso cortical, también es común la hepatoesplenomegalia. En el adulto el bazo suele ser muy pequeño, debido a episodios de infarto y fibrosis (*autoesplenectomía*).

La principal causa de muerte en niños mayores de cinco años suele ser el síndrome torácico agudo (STA) que cursa con fiebre, dolor torácico y leucocitosis.

2.2. Síndromes talasémicos o talasemias

Los síndromes talasémicos son anemias hereditarias causadas por un grupo heterogéneo de alteraciones moleculares en los genes que codifican las diferentes cadenas de globina y que ocasionan la disminución total o parcial en la síntesis de las cadenas proteicas de la hemoglobina. Como consecuencia se rompe el equilibrio normal entre las cadenas α y β y se produce una acumulación intracelular de una de ellas. La disminución de la síntesis de cadenas alfa se denomina alfa-talasemia y la de cadenas beta, beta-talasemia (7). En la actualidad, las talasemias no se consideran susceptibles de cribado ya que su detección precoz no ha demostrado beneficio clínico (8).

3. EPIDEMIOLOGIA

Originalmente las hemoglobinopatías se limitaban a poblaciones procedentes de África, América Central, América del Sur, áreas tropicales y mediterráneas, pero en los últimos años, debido al aumento cada vez mayor de los flujos migratorios están apareciendo con mayor frecuencia en zonas geográficas donde tradicionalmente no existían. En EEUU, país con una elevada proporción de población negra, la anemia falciforme afecta aproximadamente a 72.000 personas, con una incidencia de 1:1000 nacidos vivos (9-10).

En Europa, existe gran variación entre países, con una prevalencia que oscila entre el 0.14% para Dinamarca y el 9% para Grecia (11). En España, la información sobre la verdadera incidencia o prevalencia de las diferentes formas de hemoglobinopatías es escasa, ya que la mayoría de los estudios realizados corresponden a investigaciones descriptivas en regiones geográficas concretas, mostrando una distribución irregular que varía entre el 0.13% y el 1.17% (12-13).

La prevalencia de anemia falciforme en España está directamente relacionada con la frecuencia de población inmigrante, existiendo una gran heterogeneidad entre las diferentes comunidades autónomas, predominando en Madrid, Cataluña, Levante y Andalucía (14).

4. CRIBADO NEONATAL DE HEMOGLOBINOPATIAS

4.1. Introducción

En las últimas décadas, algunos países donde la incidencia de estas enfermedades comienza a ser un problema de salud público, han incorporado la detección precoz de las hemoglobinopatías a sus programas de cribado neonatal como Reino Unido, Francia y Bélgica (15-17). Ya en la década de los 80, algunos estados de los EEUU iniciaron la detección precoz de hemoglobinopatías dirigida a la población de riesgo, pero es en 1987 cuando el Instituto Americano de Salud (ANHI) recomienda el cribado universal de la anemia falciforme (18). En el año 2006 se definió el panel uniforme de cribado neonatal en EEUU que comprendía 29 patologías (*panel core*) entre las que se encuentran la anemia HbSS, HbSC y HbS- β talasemia, panel que se ha ido implantando progresivamente de modo que en la actualidad se realiza en todo el país (19).

En España, Dulín y cols. (20) realizaron en 1997 un primer estudio preliminar en 3.550 recién nacidos sobre incidencia de hemoglobinopatías estructurales en la comunidad de Madrid, al que le siguió un estudio piloto en 29.255 recién nacidos para anemia falciforme. A raíz de estos estudios, se decidió en 2004 incluir la detección universal de las hemoglobinopatías dentro de su programa autonómico de cribado neonatal (21). En 2006, presentaron un estudio prospectivo tras 24 meses de la implantación del programa en el que fueron estudiados 154.149 recién nacidos, encontrando una incidencia de 1/6165 de anemia falciforme y de 1/294 de rasgo drepanocítico (22). En otro estudio selectivo en neonatos realizado en Cataluña, se encontró una incidencia de homocigotos 1/810 en población inmigrante y ningún caso en población autóctona (23). En 2009 se publica un estudio piloto en Islas Baleares en 6.756 recién nacidos con una incidencia 1/6.756 de homocigotos y 1/199 de rasgo falciforme (24). En 2012 Yahyaoui y cols. realizan un estudio en 7.712 recién nacidos en Andalucía Oriental con una incidencia de 1/7.712 de homocigotos y 1/275 de rasgo drepanocítico (*datos no publicados*).

En 2009, los profesionales sanitarios españoles implicados en cribado neonatal de enfermedades congénitas publicaron un documento de consenso nacional. Dicho documento justifica la detección precoz de hemoglobinopatías, especialmente para el síndrome drepanocítico, que presenta un nivel de evidencia científica I y una fuerza de recomendación A (25). Sin embargo, la desigualdad en la disponibilidad de recursos hace que la oferta de los programas de cribado neonatal no sea aún homogénea entre las diferentes comunidades autónomas. En la actualidad el cribado neonatal universal de hemoglobinopatías sólo está universalmente implantado en cuatro comunidades (Madrid, País Vasco, C. Valenciana y Extremadura) con una cobertura nacional inferior al 40%. En 2013 se ha iniciado un programa piloto en Cataluña con la participación de 15 hospitales que representan el 40% de los nacimientos de esta CCAA.

4.2. Ventajas de la detección precoz

Se ha demostrado que un diagnóstico precoz junto a la eficacia de la profilaxis antibiótica y la vacunación antineumocócica y frente *Haemophilus*, puede reducir sustancialmente la morbi-mortalidad durante los 5 primeros años, debido a la disminución de la incidencia de infecciones (5,18). También se ha observado que si además se incluye una educación de los padres y un seguimiento específico, se contribuye aún más a la reducción de la mortalidad (26). Además de evitar las muertes prematuras en los neonatos enfermos el cribado neonatal presenta otra ventaja: detectar portadores que podrían transmitir la enfermedad en su descendencia, pudiéndose realizar consejo genético y planificación familiar (14).

Todo ello avala la necesidad de incorporar la detección precoz de la anemia de células falciformes a nuestros programas de cribado neonatal. La OMS ha recomendado que cada país realice programas particulares de detección de hemoglobinopatías de acuerdo con la incidencia de la enfermedad, la estructura del sistema de salud y los recursos económicos (27).

4.3. Métodos analíticos de cribado

4.3.1 Isoelectroenfoque y HPLC

Hoy en día la mayoría de los programas de cribado de hemoglobinopatías utilizan técnicas de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) o de Isoelectroenfoque (IEF) en eluidos de sangre seca en papel como métodos de screening. Ambos sistemas tienen una sensibilidad y especificidad muy cercanas al 100% y detectan HbA, F, S, C, E, A2, D-Punjab y O-Arab entre otros.

La HPLC-CE o cromatografía líquida de alta resolución de intercambio catiónico es la técnica más empleada y permite la separación de la HbA de cada una de las variantes según el tiempo de retención característico de cada una de ellas. Es un equipo semiautomatizado que utiliza una minicolumna que contiene en su interior una resina o material polimérico de intercambio catiónico. El sistema combina dos soluciones amortiguadoras de fosfato para dilución a diferentes concentraciones, que se introducen dentro del flujo analítico a una tasa controlada de 2 mL/min. El analizador muestra los cromatogramas e imprime los resultados aproximadamente a los 3 minutos de la inyección (ver figuras 1 y 2).

Figura 1. FA: cromatograma normal de recién nacido, se observan los picos de hemoglobina F y hemoglobina A).

Peak	Peak Name	Retention Time (min)	Height	Area	Area%
1	FAST	0.112	84037	176899	4.7
2	Unknown	0.223	50798	87716	2.3
3	F1	0.304	209269	927691	24.5
4	F	0.502	816231	2027598	53.6
5	OTHER(1)	0.655	14211	32300	0.9
6	Unknown	0.713	17169	28951	0.8
7	A	0.788	183415	500627	13.2

Pattern: FA
 Total Area: 3781782

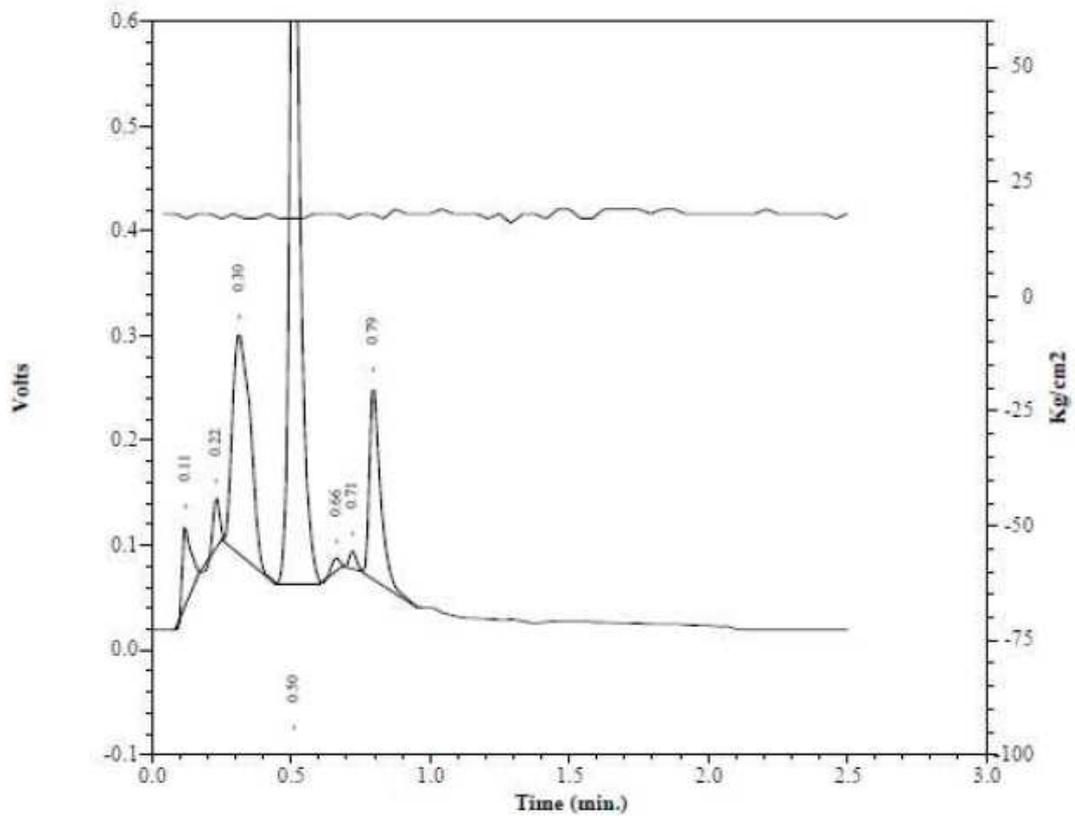
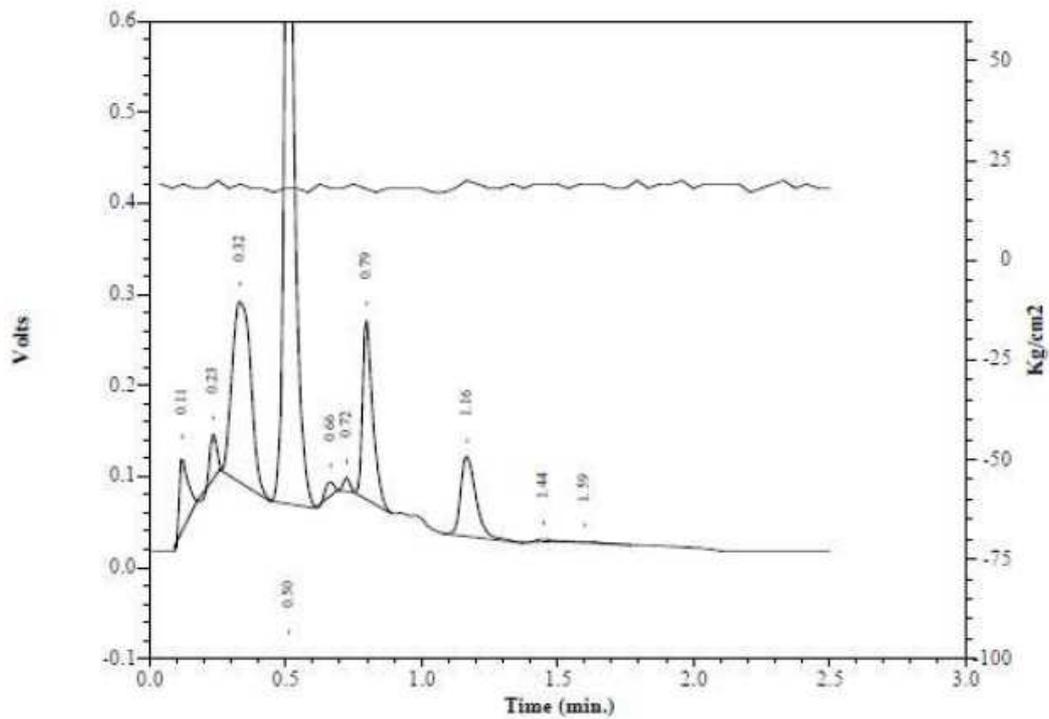


Figura 2. FAS: cromatograma de recién nacido con rasgo falciforme, se observan los picos de hemoglobina F, hemoglobina A y hemoglobina S).

Peak	Peak Name	Retention Time (min)	Height	Area	Area%
1	FAST	0.112	90208	193222	4.4
2	Unknown	0.226	52831	99056	2.3
3	F1	0.324	197359	949286	21.8
4	F	0.502	887342	2188064	50.2
5	OTHER(1)	0.656	17756	40855	0.9
6	Unknown	0.716	15395	24434	0.6
7	A	0.789	197359	502203	11.5
8	S	1.159	87556	342628	7.9
9	OTHER(5)	1.439	3285	11514	0.3
10	Unknown	1.591	1257	9657	0.2

Pattern: FAS
 Total Area: 4360918



4.3.2 Espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

La espectrometría de masas en tándem (MS/MS) consiste en una plataforma múltiple capaz de identificar y cuantificar más de 200 compuestos en un solo análisis según su relación masa/carga, con alta sensibilidad y especificidad siendo cada vez más utilizada para el cribado neonatal de errores congénitos del metabolismo. Esta tecnología también puede ser empleada para el cribado de hemoglobinopatías siendo, de hecho, método de referencia para la detección de variantes de hemoglobina (3,28). Clásicamente los métodos anteriormente descritos para detección de hemoglobinopatías en sangre seca en papel por MS/MS presentaban una preparación previa de la muestra muy engorrosa (29-33). En 2008, Boemer y cols. desarrollaron un nuevo método muy sensible y específico con una preparación simplificada de la muestra, basado en la digestión proteica enzimática con tripsina, sin encontrar discrepancias diagnósticas con la HPLC y el IEF, ofreciendo una alternativa metodológica eficaz y económica para la realización del cribado neonatal de hemoglobinopatías si se dispone del instrumento (3).

4.3.3 Electroforesis capilar

Se presenta como una buena alternativa metodológica pero uso está aún muy poco extendido (34).

5. DIAGNÓSTICO

Para el diagnóstico de hemoglobinopatías se requiere un conjunto de pruebas complementarias de laboratorio: hemograma (analizadores automáticos) para determinar los principales parámetros hematológicos de sangre periférica, frotis de sangre periférica, electroforesis de hemoglobinas o HPLC para identificar las variantes de hemoglobina, cuantificación de Hb A₂ y Hb F por HPLC, y estudios de ADN. Otros métodos con potencial futuro para identificación de variantes de hemoglobina incluyen el inmunoanálisis y la espectrometría de masas (35).

6. TRATAMIENTO

El tratamiento en niños con drepanocitosis incluye medidas para prevenir las complicaciones específicas de la enfermedad: profilaxis con penicilina oral (recomendable entre los 2 meses y los 5 años de edad) y vacunaciones (neumocócica heptavalente desde los 2 meses de edad, neumocócica polisacárida 23-valente desde los dos años y virus *influenzae* desde los 6 meses, anualmente).

El tratamiento de las complicaciones es principalmente sintomático: terapia con transfusiones (anemia aguda grave y otras indicaciones muy limitadas) y tratamiento con hidroxiurea en casos moderados o graves (revierte la conversión de cadenas de globina γ a β en las células rojas precursoras, aumentando la producción de HbF). La única terapia curativa disponible en la actualidad es el trasplante de médula ósea, siendo necesaria una adecuada selección de pacientes (35).

7. CASO PRÁCTICO

Motivo de ingreso: Lactante varón de 11 meses que ingresa en Pediatría a través de Urgencias por impotencia funcional de la pierna derecha con tumefacción progresiva a nivel del muslo desde hace 5 días y fiebre de hasta 38.5 °C durante 2 días hasta hace 72 horas. No tos ni mucosidad, no vómitos. Heces y orina normales. No refiere heridas, traumatismos ni vacunaciones recientes.

Antecedentes personales:

Embarazo controlado con diabetes gestacional y parto a las 42 semanas.

Parto: cesárea por circular de cordón. Peso al nacer: 3.900 gramos. Lactancia materna y beikost reglado. Vacunas según calendario andaluz (hasta los 6 meses). No vacunas extra (neumocócica, Rotavirus).

Enfermedades previas: fue derivado el mes anterior a Reumatología por presentar cuadro autolimitado de tumefacción difusa de los dedos de ambas manos de dos semanas de duración.

Antecedentes familiares:

Padres y un hermano sano. Origen nigeriano. No refieren antecedentes de anemias ni otras enfermedades en la familia. Viven en España desde hace 11 años. Hace 5 años que no viajan a Nigeria.

Exploración:

Peso: 12kg (p97). TA 81/59 mmHg. FC 117 lpm. Afebril.

Buen estado general. Contento. Sonríe. Discreta palidez mucosa. No ictericia.

Cabeza y Cuello: no adenopatías. Tórax: normoconformado. No adenopatías. Auscultación cardíaca: taquicardia 100-110 lpm. Tonos netos y rítmicos. No soplos. Auscultación pulmonar: buena entrada de aire bilateral, no ruidos patológicos.

Abdomen blando y depresible, no masas ni megalias.

Locomotor: rechaza la bipedestación. Postura antiálgica con flexión y rotación externa de cadera y rodilla derechas. Aumento de calor local en todo el miembro inferior derecho. Destaca a la inspección un aumento marcado del perímetro del muslo derecho (27.5 cm derecho/23.5 cm izquierdo) a nivel suprarrotuliano con llanto intenso a la palpación de la zona. No puertitas de entrada ni rubefacción. Llanto intenso también a la movilización de dicha cadera sin signos inflamatorios locales en esa zona.

Sistema nervioso: exploración normal. No rigidez nuchal.

Exploraciones complementarias durante el ingreso:

Hemograma: Leucocitos 34.440/ μL (neutrófilos absolutos 14.100), Hemoglobina 8.4 g/dL, plaquetas 435.000/ mm^3 . Se repite hemograma a la semana por sospecha de anemia falciforme: Leucocitos 15.640/ μL (neutrófilos absolutos 5.380), Hematíes 2.970.000/ μL , Hematocrito 23.4%, VCM 78 fL, HCM 24.6 pg, CHCM 31.1 g/dL, Plaquetas 357.000/ mm^3 .

Reticulocitos 12.8%. Test de Coombs directo negativo.

HPLC: Hemoglobina S: 65.9%, hemoglobina F 22.3%, Hb A₂ 2.2%.

Frotis de sangre periférica: serie roja con anisopoiquilocitosis y tendencia microcítica, policromatofilia, se observan dianocitos, drepanocitos, dacriocitos, estomatocitos, esquistocitos y hematíes con distribución anómala de la hemoglobina. Se observan hematíes con cuerpo de Howell-Jolly y aislados eritroblastos ortocromáticos con hemoglobinización irregular. Sugerente de hemoglobinopatía.

Bioquímica: hierro 74 $\mu\text{g/dL}$ (VN 35-150), LDH 645 U/L (VN 87-241), transaminasas normales, bilirrubina total 0.6 mg/dL, ferritina 583 ng/mL (VN 20-388), haptoglobina <8 mg/dL (VN 30-200), ácido fólico y vitamina B12 normales. PCR 112 mg/L (VN 1.0-13).

Ecografía de abdomen: bazo de tamaño y ecogenicidad normales.

Ecografía de caderas: normal.

RM: se observa lesión medular en el tercio distal de la diáfisis femoral derecha, que no atraviesa la fisis ni afecta a la epífisis distal. Colección líquida heterogénea subperióstica que se extiende desde tercio distal del fémur hasta el tercio medio y que no destruye el periostio. Adenopatía pequeña en hueso poplíteo.

Tratamiento y evolución

Inicio de tratamiento antibiótico intravenoso empírico con cefotaxima y cloxacilina por osteomielitis de fémur derecho. Estable, afebril y mejoría significativa desde el ingreso. Al alta exploración locomotora normal.

Se diagnostica de anemia falciforme, alta hospitalaria y seguimiento en consulta externa en Pediatría y Hematología.

Recomendaciones terapéuticas: Amoxicilina-clavulánico 100/12.5mg/1mL: 3.2mL cada 8 horas; ácido fólico 5mg/24h, vacunación neumocócica.

Discusión

Se ha presentado un caso de un lactante de 11 meses que presenta dos manifestaciones óseas como debut de anemia falciforme.

-Síndrome mano-pie: es el fenómeno episódico vasooclusivo más frecuente, resultado de infartos en la médula ósea y el hueso cortical. Se suele presentar en niños pequeños como una "dactilitis" que afecta a los huesos pequeños de manos y pies que aún contienen médula ósea hematopoyética. Clínicamente se presenta como una hinchazón dolorosa aguda de uno o más dedos. La mayoría de los episodios son autolimitados y se resuelven en dos semanas.

-Osteomielitis. El diagnóstico de osteomielitis es uno de los dilemas más comunes en la drepanocitosis ya que los síntomas coinciden con los de una crisis dolorosa vasooclusiva (dolor, hinchazón y sensibilidad sobre el área afectada). Las pruebas diagnósticas más útiles para el diagnóstico diferencial son la RM y el hemocultivo. Los huesos más frecuentemente afectados son el fémur, la tibia y el húmero, y la mayoría de los pacientes presentan fiebre (a veces sólo febrícula), leucocitosis con neutrofilia y marcadores inflamatorios elevados.

Llama la atención que el lactante presentaba una anemia leve-moderada que no requirió transfusión sanguínea ni tratamiento con hidroxurea, algo que no es habitual en el debut de anemia falciforme a esta edad. Se cree que puede ser debido a los niveles elevados de hemoglobina fetal (22.3%), probablemente secundarios a otra hemoglobinopatía asociada que pudiera ser persistencia hereditaria de hemoglobina fetal (PHHF) o α -talasemia (estudio diagnóstico pendiente en la actualidad).

Es probable que la detección precoz de este caso a través de un programa de cribado neonatal hubiera permitido evitar dichas complicaciones o al menos reconocerlas inmediatamente.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Vives Corrons JL. Anemias por defectos congénitos de la hemoglobina. Hemoglobinopatías estructurales y talasemias. *Medicine*. 2001;8:2684-93.
2. Cabot A, Casado M, Barberán J, Roqueta M, Martorell Q, Bosch A. Screening neonatal de drepanocitosis en el Consorci Sanitari de Mataró. Justificación y primeros resultados. *An Esp Pediatr*. 1998;49:157-60.
3. Boemer F, Ketelslegers O, Minon JM, Bours V, Schoos R. Newborn Screening for Sickle Cell Disease Using Tandem Mass Spectrometry. *Clin Chem* 2008;54:12 2036–2041.
4. Modell B, ed. Guidelines for the control of haemoglobin disorders. Begun at: VI th Annual Meeting of the WHO Working Group on Haemoglobinopathies; 1989 Apr 8-9; Cagliari Sardinia.
5. Gaston MH, Verter JJ, Woods G, Pegelow C, Kelleher J, Presbury G, et al. Prophylaxis with oral penicillin in children with sickle cell anemia: a randomized trial. *N Engl J Med* 1986;314:1593–9.
6. Beutler E. Hemoglobinopatias. In: Interamericana M-H, editor. *Harrison. Principios de Medicina interna*. Madrid; 1998. Pag. 737-44.
7. Vives Corrons JL. Hemoglobinopatias y talasemias. In: Sans-Sabrafen. J, editor. *Hematología Clínica*. 3 ed. Barcelona: Mosby/Doyma; 1994. p147-169.
8. Martínez-Calvo A (director). Cribado neonatal de hemoglobinopatías. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Galicia. 2004.
9. Petrou M, Modell B. Prenatal Screening for haemoglobin disorders. *Prenat Diagn*. 1995;15(13):1275-95.
10. United States Preventive Services Task Force (USPSTF). Screening for hemoglobinopathies. *Guide to clinical preventive services*. 2nd ed. Congenital disorders; 1996.
11. Angastinotis M, Modell B, Englezos P, Boulyjenkov V. Prevention and control of haemoglobinopathies. *Bull World Health Org*. 1995;73:375-86.
12. Baiget M, Del Río E, Domenech M, Casals T, Bozzo M, Gimferrer E. Escrutinio de hemoglobinopatías en sangre de cordón umbilical. *Biol Clin Hematol* 1981; 3: 251-256.

13. González FA, Hojas R, Ropero P, Villegas A. Aumento de la incidencia de hemoglobinopatías estructurales y talasemias en España. *Haematologica* 2002; 87 (Supl. 1): 368-372.
14. Ruano-Ravina A, Jato-Díaz M, Cerdá-Mota T. Cribado neonatal de hemoglobinopatías. Una reflexión sobre su aplicación en España. *Med Clin (Barc)*. 2006; 126(9):337-40.
15. Gulbis B, Tshilolo LC, F, Lin C, Vertongen F. Newborn screening for Haemoglobinopathies: the Brussels experience. *J Med Screen*. 1999;6(1):11-5.
16. Almeida AM, henthorn JS, Davies SC. Neonatal screening for haemoglobinopathies: the results of 10-year program in an English Health Region. *Br J Heamatol*. 2001;112(1):32-5.
17. Bardakjian-Michau J, Guilloud-Bataille M, Maier-Redelsperger M, Elion J, Girot R, Feingold J, et al. Decreased morbidity in homozygous sickle cell disease detected at birth. *Hemoglobin*. 2002;26(3):211-7.
18. Consensus conference. Newborn screening for sickle cell disease and other hemoglobinopathies. *JAMA*.1987;258:1205-9.
19. Watson M, Lloyd-Puryear M, Mann M, Rinaldo P, Howell R (editors). Newborn Screening. Main Report. *Genet Med* 2006;8: 12S-252S.
20. Dulín E, Romero M, Bertoli GL. Screening neonatal de hemoglobinopatías. Estudio preliminar. XXXIX Reunión Nacional de la AEHH. XIII Congreso de la SETH. *Haematologica*. 1997; 82:3.
21. Joyanes B, Moro M, Ropero P, Briceno O, Dulín E, Villegas A. Screening of hemoglobinopathies in a cohort of newborns in Madrid. *MedClin (Barc)*.2006;126:290-2.
22. Cela de Juliána E, Dulín Íñiguez E, Guerrero Solera M, Arranz Leiradoc M, et al. Evaluación en el tercer año de implantación del cribado neonatal universal de anemia falciforme en la Comunidad de Madrid. *An Pediatr (Barc)*. 2007;66(4):382-6.
23. Manu-Pereira MM, Maya A, Cararach V, et al. Neonatal screening of hemoglobinopathies and glucose-6-phosphate dehydrogenase in Catalonia. Pilot study in anonymous not related population. *Med Clin (Barc)*.2006;126:281-5.
24. López-Escribano H, Vila M, Barceló A, Riesco M, Ayllón O. Cribado neonatal de anemia falciforme en la Comunidad Autónoma Balear. Estudio piloto anónimo no relacionado. *An Pediatr (Barc)*. 2009;70(5):429-433.
25. Marín Soria J L, Aldamiz-Echevarria L, Castiñeiras Ramos DE, Dalmau Serra J, Fernández Sánchez A, González Lamuño D, Juan Fita M J, Jiménez Jiménez LM,

Pérez–Cerdá C. Programas de cribado neonatal en España: Actualización y propuestas de futuro. Documento de consenso. 31/05/2009.

26. Githens JH, Lane PA, McCurdy RS, Houston ML, McKinna JD, Cole DM. Newborn screening for hemoglobinopathies in Colorado. The first 10 years. *Am J Dis Child*. 1990;144:466-70.

27. World Health Organization. Guidelines for the control of haemoglobinopathies disorders; 1994.

28. Kleinert P, Schmid M, Zurbriggen K, Speer O, Schmutz M, Roschitzki B, et al. Mass spectrometry: a tool for enhanced detection of hemoglobin variants. *Clin Chem* 2008;54:69-76.

29. Wild BJ, Green BN, Stephens AD. The potential of electrospray ionization mass spectrometry for the diagnosis of hemoglobin variants found in newborn screening. *Blood Cells Mol Dis* 2004;33:308–17.

30. Daniel YA, Turner C, Haynes RM, Hunt BJ, Dalton RN. Rapid and specific detection of clinically significant haemoglobinopathies using electrospray mass spectrometry. *Br J Haematol* 2005;130:635–43.

31. Daniel YA, Turner C, Haynes RM, Hunt BJ, Dalton RN. Quantification of hemoglobin A2 by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2007;53:1448–54.

32. Wild BJ, Green BN, Cooper EK, Lalloz MR, Erten S, Stephens AD, et al. Rapid identification of hemoglobin variants by electrospray ionization mass spectrometry. *Blood Cells Mol Dis* 2001;27:691–704.

33. Rai DK, Griffiths WJ, Alvelius G, Landin B. Electrospray mass spectrometry: an efficient method to detect silent hemoglobin variants causing erythrocytosis. *Clin Chem* 2001;47:1308–11.

34. Giordano PC. Newborn screening for hemoglobinopathies using capillary electrophoresis. *Methods Mol Biol* 2013;919:131-45.

35. Drepanocytosis. Otras hemoglobinopatías hereditarias. Castro JR, Doménech E, López-Almaraz R. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias 3ª Edición (Sanjurjo P y Baldellou A, editores). Ergon. 2010.