

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 616.194.125-053.1-074:577.2.08

Э.Р. Абдулалимов, Ч.Д. Асадов, Т.А. Мамедова, С.Н. Кафарова, Е.Д. Кулиева

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДВУХ МЕТОДОВ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ БЕТА-ГЛОБИНОВОГО ГЕНА**

НИИ гематологии и трансфузиологии им. Б.А. Эйвазова, Баку

*В настоящее время в мире в основном используется два метода определения мутаций бета-глобинового гена: амплификация рефрактерной мутационной системы (АРМС) и обратная дот-блот-гибридизация. Целью нашего исследования явилось сравнительное изучение эффективности этих методов молекулярной диагностики для выявления талассемических мутаций в Азербайджане. Всего было обследовано 82 человека как с гомозиготной, так и гетерозиготной талассемией, а также дрепаноталассемией. У обследованных были выявлены 146 мутантных аллелей, из которых 132 были талассемическими (16 различных мутаций), а 14 относились к гемоглобину S (Cod6(A>T)). Сравнение эффективности указанных методов определения мутаций бета-глобинового гена позволило сделать вывод о том, что оба сравниваемых метода пригодны для диагностики талассемических мутаций, однако метод обратной дот-блот-гибридизации имеет ряд преимуществ и является наилучшим вариантом для Азербайджана.*

**Ключевые слова:** бета-глобиновый ген, мутации, методы, АРМС, ОГ, сравнение

*E.R. Abdulalimov, Ch.D. Asadov, T.A. Mamedova, S.N. Kafarova, E.D. Kuliyeva*

**THE COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF TWO METHODS OF DETECTION OF MUTATIONS OF BETA-GLOBIN GENE**

*Nowadays, two methods of detection of mutations of beta-globin gene are applied: amplification of refractory mutation system and reverse dot-blot-hybridization. The study was implemented to comparatively analyze effectiveness of these methods of molecular diagnostic in detection of thalassemic mutations in Azerbaijan. The examined sample consisted of 82 patients with both homozygous and heterozygous thalassemia and drepanothalassemia as well. In examined patients 146 mutant alleles were detected; 132 were thalassemic ones (16 various mutations) and 14 ranked among hemoglobinosis S (cod6(A>T)). The comparison of effectiveness of mentioned methods made it possible to conclude that both compared methods fit the diagnostic of thalassemic mutations. However, the method of inverse dot-blot-hybridization has a number of advantages and is the best choice for Azerbaijan.*

**Key words:** beta-globin gene, mutation, method, amplification of refractory mutation system, reverse hybridization, comparison

Установлено, что ежегодно в мире рождается более 7 млн младенцев с врожденной патологией и генетическими заболеваниями. Примерно 25% этих патологий составляет 5 заболеваний, в число которых входят наследственные гемоглобино- и энзимопатии. Предполагается, что ежегодно в мире рождается около 300 000 детей с серповидно-клеточной анемией и талассемией [7]. До настоящего времени было выявлено более 700 структурных вариантов гемоглобина, более 200 генетических мутаций, приводящих к талассемии [9].

Азербайджан относится к странам с широким распространением талассемии. Проведенные ранее эпидемиологические исследования показали что: 1) в различных регионах страны частота распространения бета-талассемического гена колеблется от 0 до 17%, составляя в среднем 8,7%; 2) один из 526 родившихся детей может быть гомозиготным по гену бета-талассемии; 3) количество гомозиготных больных талассемией доходит до 1000 [2, 3].

Основные методы лечения талассемии – пожизненное регулярное переливание крови и применение железывыводящих препаратов. Наряду с тем что эти методы лечения обходятся очень дорого, они очень обременительны и мучительны для больных и членов их семей. По этой причине наряду с усовершенствованием лечения больных талассемией необходимы разработка и внедрение в практику программы предотвращения рождения больных талассемией детей. Основным этапом профилактики талассемии является проводимая в I

триместре беременности молекулярно-генетическая диагностика талассемических мутаций у плода. Возможность такой диагностики обуславливается наличием данных о молекулярных дефектах бета-глобинового гена в данном регионе. Ранее проведенные молекулярно-генетические исследования бета-глобинового гена в Азербайджане позволили выявить 20 талассемических мутаций [6].

В настоящее время в мире в основном используется два метода определения мутаций бета-глобинового гена: амплификация рефрактерной мутационной системы (АРМС) и обратная дот-блот-гибридизация (далее обратная гибридилизация – ОГ). Целью нашего исследования явилось сравнительное изучение эффективности этих методов молекулярной диагностики для выявления талассемических мутаций в Азербайджане.

**Материалы и методы.** Образцы крови обследуемых собирали в пробирки, содержащие ЭДТА. Диагноз талассемии ставили по результатам скрининг-тестов на основе показателей красной крови и фракций гемоглобина. Определяли количество эритроцитов, содержание гемоглобина, показатели гематокрита и эритроцитарных индексов – средний объем эритроцитов, среднее содержание гемоглобина и среднюю концентрацию гемоглобина – на гематологическом анализаторе Sysmex XT2000i (Япония). Кроме того, во всех случаях проводили исследования фракций гемоглобина методом высокоразрешающей жидкостной хроматографии на аппарате VARIANT II Haemoglobin Testing System компании BIO-RAD (США). Для выявления мутаций бета-глобинового гена ДНК экстрагировали из белых кровяных клеток по методу M. Poncz и соавт. [8]. Для амплификации ДНК использовали термоциклер C-1000 компании BIO-RAD (США), гельдокументацию проводили на аппарате Biometra Gel Documentation System (США).

Талассемические мутации выявляли параллельно двумя методами: АРМС и ОГ.

Для корреспонденции:

Асадов Чингиз Дашир оглы, рук. отдела наследственной патологии эритрона

Адрес: AZ1007, Баку, ул. Мирали, 87

E-mail: asadovchingiz@gmail.com

Таблица 1

**Количество выявленных методами АРМС и ОГ мутантных аллелей в образцах ДНК, выделенных из крови обследованных**

Форма бета-талассемии	Число обследованных	Мутантные аллели	
		талассемические	Cod6 (A>T), HbS
Гомозиготы	34	68	–
Компаунды по гену бета-талассемии	16	32	–
Гетерозиготы	18	18	–
Дрепаноталассемия	14	14	14
Всего ...	82	132	14

**АРМС.** В основе метода АРМС лежит проведение двух ПЦР. В обеих реакциях используются праймеры с одинаковой олигонуклеотидной последовательностью для проведения амплификации участков ДНК с одинаковой протяженностью. Для каждой из реакций используются аллельспецифические праймеры с комплементарной исследуемому участку ДНК олигонуклеотидной последовательностью, где для одной реакции используется мутантная, а для другой – нативная. Следовательно, если в исследуемом участке ДНК имеется мутация, то амплификат образуется в том образце, где есть аллельспецифические праймеры с мутантной олигонуклеотидной последовательностью.

**ОГ.** Исследование методом ОГ проводили с использованием коммерческих тест-систем для выявления мутаций ( $\beta$ -Globin StripAssay Kit, ViennaLab Cat. No. 4–130, ViennaLab Diagnostics, Вена, Австрия), основанной на ОГ [5], согласно инструкции к тест-системам. Тест-стрип содержит 22 олигонуклеотидных зонда, параллельно расположенных на мембра-

Таблица 2

**Мутации, выявленные методами АРМС и ОГ в образцах ДНК, выделенных из крови обследованных**

Мутации	Количество выявленных мутаций		Соотношение мутаций, %
	метод АРМС	метод ОГ	
Codon 8 (-AA)	41	41	31
IVS 1.6 (T>C)	25*	25	18,94
IVS 2.1 (G>A)	24	24	18,2
IVS 1.110 (G>A)	7	7	5,3
Codon 39 (C>T)	5	5	3,78
IVS 1.1 (G>A)	5	5	3,78
Codon 8/9 (+G)	4	4	3,03
IVS 2.745 (C>G)	3	3	2,27
–30 (A>T)	3	3	2,27
IVS 1.5 (G>C)	3	3	2,27
Codon16 (-C)	3	3	2,27
Codon 30 (G>C)	2	2	1,51
IVS 1.130 (G>C)	2	2	1,51
Codon 37 (TGG-TGA)	2	2	1,51
Codon 44 (-C)	2	2	1,51
Codon 22 (-7bp del)	1	1	0,76
Всего ...	130	132	100

Примечание. \* – в одном случае был получен ложноположительный результат, при повторном исследовании результат был положительным.

не: – 101 (C>T); – 87 (C>G); – 30 (T>A); Codon 5 (-CT); Codon 6 (G>A) HbC; Codon 6 (A>T) HbS; Codon 6 (-A); Codon 8 (-AA); Codon 8/9 (+G); Codon 15 (TGG>TGA); Codon 27 (G>T); IVS1-1 (G>A); IVS1-5 (G>C); IVS1-6 (T>C); IVS1-110 (G>A); IVS1-116 (T>G); IVS1-130 (G>C); Codon 39 (C>T); Codon 44 (-C); IVS2-1 (G>A); IVS2-745 (C>G); IVS2-848 (C>A).

Всего было обследовано 82 человека как с гомозиготной, так и гетерозиготной талассемией и дрепаноталассемией (S/ $\beta$ -талассемией) (табл. 1). У обследованных было выявлено 146 мутантных аллелей, из которых 132 были талассемическими, а 14 относились к гемоглобину S [Cod6 (A>T)].

**Результаты и обсуждение.** В результате проведенных исследований выявлено 16 различных талассемических мутаций, причем обоими методами (табл. 2).

Как следует из табл. 2, с наибольшей частотой (31%) была выявлена мутация Codon 8 (-AA), далее в убывающем порядке следуют мутации IVS 1.6 (T>C) и IVS 2.1 (G>A) почти с одинаковой частотой – соответственно 18,94 и 18,20%. Частота остальных мутаций невелика и колеблется от 0,76 до 5,3%.

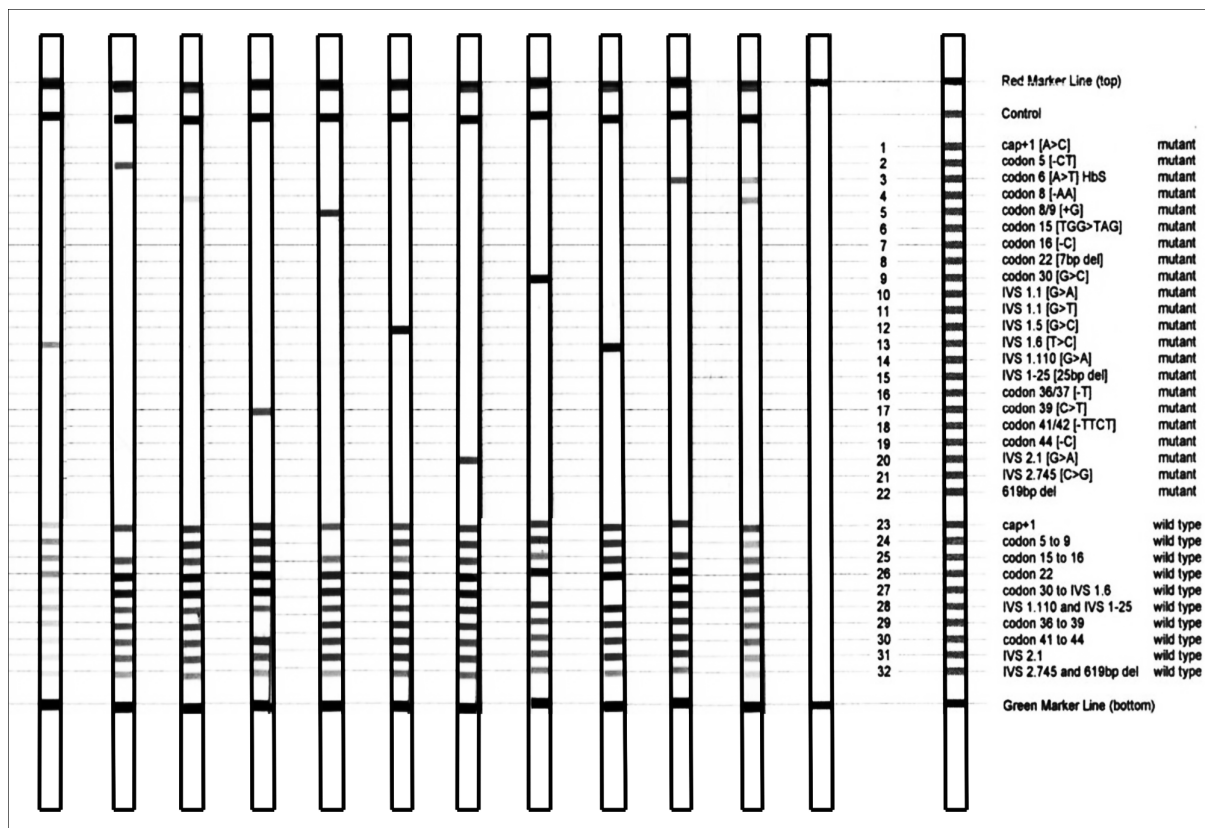
На рисунке представлены тест-стрипы с некоторыми выявленными нами методом ОГ мутациями.

На рисунке слева направо указаны следующие мутации: IVS1.6 (T>C) в гетерозиготном состоянии, Codon 5 (-CT) в гомозиготном состоянии, Codon 8 (-AA) в гетерозиготном состоянии, Codon 39 (C>T) и Codon 8/9 (+G) в гомозиготном состоянии, IVS1.5 (G>C) и IVS2.1 (G>A) в гетерозиготном состоянии, Codon 30 (G>A), IVS1.6 (T>C) и Codon 6 (A>T) HbS в гомозиготном состоянии, Codon 8 (-AA) и Codon 6 (A>T) HbS (компаунд в гетерозиготном состоянии).

Таблица 3

**Сравнение различных факторов, определяющих эффективность методов АРМС и ОГ в выявлении мутаций бета-глобинового гена**

Фактор	АРМС	ОГ
Затраченное время	Несколько дней	6–8 ч
Минимально необходимое количество специалистов для проведения всех этапов метода	2	1
Специфичность	Высокая	Высокая
Воспроизводимость	Зависит от многих факторов	Очень высокая
Количество ПЦР для выявления одной мутации	4–64	1
Количество выявляемых мутаций за 1 тест	1	Более 20
Проведение дополнительного процесса по документации	Требуется	Не требуется
Исходный материал	Зависит от количества ПЦР	0,5 мкг геномной ДНК для одной ПЦР
Токсические вещества	Бромид этидия (канцероген)	Не используются
Одновременное выявление аномальных гемоглобинов	Невозможно	Выявляются аномальные гемоглобины S и C
Оборудование	Дорогое, требуется несколько приборов для ПЦР, гель-электрофорез, система для фото-документации	Относительно дешевое, можно обойтись одним прибором для ПЦР, небольшая водяная баня с шейкером



Стрип-тесты с образцами мутаций, выявленных методом ОГ.

Результаты исследований показали, что метод ОГ имеет ряд преимуществ по сравнению с методом АРМС (табл. 3). Он является более надежным, так как при его использовании не было ложноположительных результатов. Для метода ОГ требуется только 1 ПЦР, тогда как для метода АРМС необходимо 4 ПЦР для исследования одного образца (2 ПЦР для положительного и отрицательного контроля, 2 ПЦР для контроля мутантной и нативной аллелей).

Для выявления 16 мутаций необходимо выполнить от 4 до 64 ПЦР в зависимости от того, при каком по счету исследовании выявляется искомая мутация. Выполнение метода ОГ требует наличия меньшего количества персонала по сравнению с методом АРМС. В отличие от АРМС при применении метода ОГ не требуется проведение дополнительного процесса документирования, так как сами полоски являются документом и могут быть сохранены. По сравнению с АРМС при использовании метода ОГ время на анализ уменьшается с 2–3 дней до 6–8 ч. Это очень важно, так как в случаях пренатальной диагностики появляется возможность предоставления большего времени семьям для принятия решения о прерывании беременности и врачам для проведения абортa в наиболее безопасные для беременной сроки. Кроме этого, при ОГ требуется значительно меньшее количество ДНК (не более 0,5 мкг геномной ДНК для одной ПЦР). Это очень важно при проведении пренатальной диагностики, так как в некоторых ситуациях может не хватить экстрагированного ДНК для проведения большого количества ПЦР для выявления мутации с помощью АРМС. Еще одно преимущество метода ОГ состоит в том, что он является более экологически чистым, так как при исследовании этим методом в отличие от АРМС не используются канцерогены (бромид этидия).

Хотя на первый взгляд кажется, что метод АРМС обходится дешевле, чем ОГ (праймеры, применяемые при АРМС, стоят дешевле, чем тест-полоски, используемые при ОГ), тщательный анализ позволяет опровергнуть это утверждение. Необходимость в более дорогом оборудовании, проведение боль-

шого количества исследований для выявления одной мутации приводит к значительному увеличению затрат, реактивов и расходных материалов, необходимость в проведении дополнительного процесса по документации при АРМС, а также возможность дополнительного выявления мутаций, лежащих в основе двух основных аномальных гемоглобинов, при ОГ почти нивелирует разницу в стоимости этих методов.

В Азербайджане, где выявлено большое количество талассемических мутаций, метод ОГ является гораздо более эффективным, чем АРМС, так как позволяет в короткие сроки выявлять более 20 мутаций, приводящих к талассемии, и две мутации, лежащие в основе важнейших гемоглобинопатий (S и C). Однако в странах Средиземноморья (например, Кипр, Греция, Италия), где у подавляющего большинства населения определяется всего три талассемические мутации [4], метод АРМС может быть успешно применен.

Таким образом, в результате проведенных исследований можно сделать вывод о том, что оба сравниваемых метода определения мутаций бета-глобинового гена пригодны для диагностики талассемических мутаций, однако метод ОГ имеет ряд преимуществ и является наилучшим вариантом для Азербайджана.

*Данная работа выполнена при финансовой поддержке Фонда развития науки при Президенте Азербайджанской Республики – Грант № – EIF-2011-1(3)-82/46/3.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Асадов Ч.Д., Мамедова Т.А., Кулиева Е.Д., Шахгусейнова С.Б. Диагностика бета-талассемии. Клиническая лабораторная диагностика. 2004; 5: 45–57.
2. Рустамов Р.Ш., Гаيبов Н.Т., Ахмедова Н.М. и др. Распространение наследственных гемоглобинопатий в Азербайджане. Проблемы гематологии и переливания крови. 1981; 10: 22–6.
3. Asadov Ch.D. B-thalassemia control program in Azerbaijan. International Islamic Medical Journal. 1996; 1: 10–4.



4. *Bozkurt G.* Results from the north cyprus thalassemia prevention program. *Hernoglobin.* 2007; 31: 257–64.
5. *Cai S.P., Wall J., Kan Y.W., Chehab F.F.* Reverse dot-blot probes for the screening of  $\beta$ -thalassemia in Asians and American Blacks. *Hum. Mutat.* 1994; 3: 59–63.
6. *Curuk A., Yuregir G., Asadov Ch.* et al. Molecular characterization of  $\beta$ -thalassemia in Azerbaijan. *Human Genetics.* 1992; 90: 417–9.
7. *Modell B., Darlison M.* Global epidemiology of haemoglobin disorders, and derived service indicators. *Bulletin of the World Health Organization.* 2008; 86: 480–7.
8. *Poncz M., Solowiejczyk D., Harpel B.* et al. Construction of human gene libraries from small amounts of peripheral blood: analysis of beta-like globin genes. *Hemoglobin.* 1982; 6: 27–36.
9. *Weatherall D.J., Williams T.N., Allen S.J., O'Donnell A.* The population genetics and dynamics of the thalassemias. *Hematol Oncol. Clin. North Am.* 2010; 24: 1021–31.
2. *Rustamov R.Sh., Gaibov N.T., Akhmedova A.I., Kulieva N.M.* Incidence of hereditary hemoglobinopathies in Azerbaijan. *Problemy gematologii i perelivaniya krovi.* 1981; 9: 12–6 (in Russian).
3. *Asadov Ch.D.* B-thalassemia control program in Azerbaijan. *International Islamic Medical Journal.* 1996; 1: 10–4.
4. *Bozkurt G.* Results from the north cyprus thalassemia prevention program. *Hernoglobin.* 2007; 31: 257–64.
5. *Cai S.P., Wall J., Kan Y.W., Chehab F.F.* Reverse dot-blot probes for the screening of  $\beta$ -thalassemia in Asians and American Blacks. *Hum. Mutat.* 1994; 3: 59–63.
6. *Curuk A., Yuregir G., Asadov Ch.* et al. Molecular characterization of  $\beta$ -thalassemia in Azerbaijan. *Human Genetics.* 1992; 90: 417–9.
7. *Modell B., Darlison M.* Global epidemiology of haemoglobin disorders, and derived service indicators. *Bulletin of the World Health Organization.* 2008; 86: 480–7.
8. *Poncz M., Solowiejczyk D., Harpel B.* et al. Construction of human gene libraries from small amounts of peripheral blood: analysis of beta-like globin genes. *Hemoglobin.* 1982; 6: 27–36.
9. *Weatherall D.J., Williams T.N., Allen S.J., O'Donnell A.* The population genetics and dynamics of the thalassemias. *Hematol Oncol. Clin. North Am.* 2010; 24: 1021–31.

Поступила 23.04.13

## REFERENCES

## МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 616.916.1-078:577.21.08

Ж.В. Бузицкая, В.З. Кривицкая, В.Л. Максакова, Л.М. Цыбалова

## ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ КРАСНУШНОЙ ИНФЕКЦИИ

ФГБУ "НИИ гриппа" Минздрава Российской Федерации, Санкт-Петербург

*Для ранней диагностики краснушной инфекции, особенно в случаях, требующих дифференциально-диагностического поиска, крайне важно использовать наиболее информативные и удобные в практической работе тест-системы. Пациенты (n = 37), мужчины в возрасте от 15 лет до 21 года (средний возраст 18 лет), поступали в стационар на 1–3-й день от начала заболевания. Наличие вирусной РНК в назофарингеальных мазках методом ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией) было подтверждено у 26 (70%) обследованных, серологические маркеры начала краснушной инфекции на момент первого обследования имели 24 (65%) больных из 37 обследованных.*

*Показано, что наибольшую диагностическую значимость в подтверждении диагноза краснушной инфекции в первые дни заболевания имеет метод ОТ-ПЦР, в дальнейшем возрастает информативность методов серодиагностики, на разных сроках заболевания требуется комплексное применение методов ИФА (IgM) и ОТ-ПЦР.*

**Ключевые слова:** диагностика краснухи, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), серологические маркеры

*J.V. Buzitskaya, V.Z. Krivitskaya, V.L. Maksakova, L.M. Tsybalova*

### THE DIAGNOSTIC VALUE OF SEROLOGICAL AND MOLECULAR GENETIC METHODS IN DETECTION OF GERMAN MEASLES DISEASE

The research institute of influenza of Minzdrav of Russia, St. Petersburg, Russia

*The early diagnostic of German measles infection, especially in cases requiring differential diagnostic search, the most informative and usable in practice test-systems are needed to be applied. The sampling of patients (n=37) included males aged from 15 to 21 year (average age - 18 years) were admitted to hospital on 1-3 day from onset of disease. The technique of polymerase chain reaction with reverse transcription was applied to detect presence of viral RNA in nasopharyngital smear. The presence of viral RNA was confirmed in 26 examined patients (70%). The serological markers of onset of disease at the moment of first examination had 24 (65%) out of 37 patients. It is demonstrated that technique of polymerase chain reaction with reverse transcription has the most diagnostic value in confirmation of diagnosis of German measles infection at the first days of disease. In the sequel, the informativeness of methods of serological diagnostic will increase because complex application of methods of IgM and polymerase chain reaction with reverse transcription are needed at different periods of disease.*

**Key words:** diagnostic, German measles, polymerase chain reaction with reverse transcription, serological marker