



**УНИВЕРЗИТЕТ “ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ” – ШТИП
ФАКУЛТЕТ ЗА МЕДИЦИНСКИ НАУКИ
Штип**

Драгица Близнаковска Станчев

**ГЕНЕТСКО ДИЈАГНОСТИЦИРАЊЕ НА ФАМИЛИЈАРНА МЕДИТЕРАНСКА ТРЕСКА –
ПРИКАЗ НА СЛУЧАЈ ОД РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА**

СПЕЦИЈАЛИСТИЧКИ ТРУД

Штип, 2017

Комисија за оценка и одбрана:	
Ментор:	Проф. Д-р. Данијела Јаниќевиќ Ивановска
Претседател на комисија	Проф. Д-р. Васо Талевски
Член	Проф. Д-р. Биљана Ѓорѓеска

Апстракт

Фамилијарна медитеранска треска (ФМТ, MIM249100) е автоинфламаторна генетска болест која се карактеризира со повторливи болни напади во пределот на стомакот, градите или зглобовите, обично е придружена со висока телесна температура. Тоа класично се наследува автосомно рецесивно. Поврзано со мутации на MEFV, кој ги кодира протеинот пирин. До сега, повеќе од 140 мутации на генот MEFV се дефинирани во светот. И покрај напредокот, од 1997 година се направени тестови практични за рутинска употреба, околу 20% од пациентите со Фамилијарна медитеранска треска останале без забележливи мутација во генот на MEFV. Ова е главната причина зошто дијагнозата останува се уште клиничка, според критериумите Tel Hashomer. 10-годишно девојче примено на Клиниката за педијатрија на Медицинскиот факултет во Скопје за необјаслива треска; бројни лабораториски анализи и специјалистички консултации беа направени. Поради недостаток на други објаснувања за треска, побарано е генетско тестирање за Фамилијарна медитеранска треска. Присуството на хетерозиготна E148Q мутација беше потврдено на Институтот за Имунобиологија и хумана генетика со користење на методот обратна хибридизација. Администрација на колхицин, терапија на избор, во доза од 1,5 mg/ден, да доведе до потполно повлекување на симптомите во рок од неколку дена по почетокот.

Иако болеста класично се наследува по рецесивен начин, некои атипични случаи на автосомно доминантно наследување се опишани. Нашиот пациент може да биде уште еден пример за поддршка на необичен доминантно наследување, од хетерозиготна состојба за мутација E148Q е единствениот позитивен наод во генотипизација на 12 најчести MEFV мутации.

Клучни зборови: Фамилијарна медитеранска треска, генетско тестирање, MEFV E148Q.

Abstract

The Familial Mediterranean Fever (FMF, MIM249100) is an autoinflammatory genetic disease characterized with recurrent painful attacks in the abdomen, chest or joints, usually accompanied with high body temperature. It is classically inherited in an autosomal recessive manner. It is associated with mutations of the MEFV gene, coding for the protein pyrin. More than 140 mutations of the MEFV gene are defined worldwide. Despite the progress in establishing reliable tests practical for routine use, as much as 20% of the patients with FMF remain without a detectable mutation in the MEFV gene. This is the main reason why the diagnosis of FMF remains still a clinical one, according to Tel Hashomer criteria.

A 10-year old girl admitted to the Clinic of Pediatrics at the Faculty of Medicine in Skopje for unexplained fever. After numerous laboratory analyses and specialist consultations were done, genetic testing for FMF was requested. The presence of an heterozygous mutation E148Q was confirmed at the Institute for Immunobiology and Human Genetics using a PCR based, reverse hybridization method. Administration of colchicine, the therapy of choice, in a dose of 1.5 mg/day, lead to complete resolution of the symptoms within some days following commencement.

Although the disease is classically inherited in a recessive manner, some atypical cases of autosomal dominant inheritance are described. Our patient may be another example supporting the unusual dominant inheritance, since the heterozygous state for the E148Q mutation was the only positive finding in the genotyping of the 12 most frequent MEFV mutations.

Keywords: Familial Mediterranean fever, genetic testing, MEFV E148Q

Содржина:

1. Вовед	1
1.1. ЕТИОЛОГИЈА НА БОЛЕСТА.....	2
1.2. КЛИНИЧКА СЛИКА.....	4
1.3. ФАМИЛИЈАРНА МЕДИТЕРАНСКА ТРЕСКА.....	5
1.4. ЛАБОРАТОРИСКИ АНАЛИЗИ.....	6
1.5. ПОСТАВУВАЊЕ НА ДИЈАГНОЗА.....	7
2. Цел	10
3. ПРИКАЗ НА СЛУЧАЈ	11
5. МЕТОДИ НА ИСТРАЖУВАЧКАТА РАБОТА	14
5.1. ИЗОЛАЦИЈАТА НА ГЕНОМСКАТА ДНК.....	14
5.2. ПОЛИМЕРАЗНО ВЕРИЖНА РЕАКЦИЈА ПВР.....	15
5.3. ПРОТОКОЛ ЗА ПВР.....	16
5.4. ПРОТОКОЛ ЗА АМПЛИФИКАЦИЈА.....	16
5.5. ЕЛЕКТРОФОРЕЗА.....	16
5.6. МЕТОДА НА РЕВЕРЗНА ХИБРИДИЗАЦИЈА.....	18
5.7. ПРОТОКОЛ ЗА ХИБРИДИЗАЦИЈА.....	18
6. ЧИТАЊЕ НА РЕЗУЛТАТИ	20
7. ДИСКУСИЈА	22
8. ЗАКЛУЧОК	24
9. REFERENCES	

1. Вовед

Фамилијарна медитеранска треска (ФМФ, MIM249100) е генетска мулти-системска болест со повторливи болни напади во пределот на стомакот, градите или зглобовите како главна карактеристика. Обично, нападите се придружени со покачена телесна температура, а понекогаш и треска. Болеста беше призната како посебен ентитет во 1945 година ¹. Денес, таа е позната под многу имиња, како што се повторлив наследен полисерозитис, бениген пароксизмален перитонитис, периодична треска, периодичен амилоиден синдром, ерменски синдром или периодичн болест Reimann ^{2,3,4,5}. Најчесто, оваа болест се сретнува кај луѓето кои потекнуваат од регионот на Средоземното море (од тука и името), и најчеста е кај четири популации: Сефарди Евреите (1 / 250-1000), Ерменци (1/500), Турци (1 / 1000) и Арапите (1/2600). ^{3,4,6} Кај останатите други популации, болеста се сретнува значително поретко. Најголем број на пациенти со ФМФ (80-95%) се на возраст до 20 години, во време на дијагнозата, додека 50-60% од нив се помлади од 10 години ^{7,8}. Главните компликации поврзани со оваа болест се деструктивен олигоартритис и секундарна амилоидоза која може да доведе до смрт ^{9,10,11,12}. Болеста класично се наследува автозомно рецесивно. По идентификувањето на генот одговорен за болеста, MEFV, во 1997 година, голем број на студии се спроведени со цел да се испита дистрибуцијата на различни MEFV мутации низ населението и различната фенотип-генотип корелација ^{4,6,12}.

¹ Bakkaloglu A. Familial Mediterranean fever. *Pediatr Nephrol.* 2003 Sep; 18(9):583-9. Ben-Chetrit E, Levy M; Familial Mediterranean fever. *The Lancet* 1998; Vol 351:659-64

² Ben-Chetrit E, Levy M; Familial Mediterranean fever. *The Lancet* 1998; Vol 351:659-64.

³ Booth DR, Gilmore JD, Lachmann HJ et al: The genetic basis of autosomal dominant familial Mediterranean fever. *Q J Med* 2000; 93:217– 221.

⁴ Brik R, Shinawi M, Kasinetz L, Gershoni-Baruch R: The musculoskeletal manifestations of familial Mediterranean fever in children genetically diagnosed with the disease. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1416– 1419.

⁵ Cazeneuve C, Sarkisian T, Pecheux C et al: MEFV-gene analysis in Armenians patients with FMF: diagnostic value, unfavorable renal prognosis of the M694V homozygous genotype, genetic and therapeutic implications. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 88– 97.

⁶ Cazeneuve C, Ajrapetyan H, Papin S et al: Identification of MEFV-independent modifying genetic factors for familial Mediterranean fever. *Am J Hum Genet* 2000; 67:1136–1143.

⁷ Dewalle M, Domingo C, Rozembaum M et al: Phenotype/genotype correlation in Jewish patients suffering from familial Mediterranean fever (FMF). *Eur J Hum Genet* 1998; 6:95–97.

⁸ El-Shanti HE. Familial Mediterranean Fever. *Saudi Med J.* 2001;22(2):104-9.

⁹ Gedalia A. Familial Mediterranean fever in Nelson, *Text book of pediatrics*, 17th ed. W. B. Saunders Company 2004:821-2.

¹⁰ Gershoni-Baruch R, Brik R, Zacks N, Shinawi M, Lidar M, Livneh A: The contribution of genotypes at the MEFV and SAA1 loci to amyloidosis and disease severity in patients with familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1149– 1155.

¹¹ Gershoni-Baruch R, Brik R, Shinawi M, Livneh A: The differential contribution of MEFV mutant alleles to the clinical profile of familial Mediterranean fever. *Eur J Hum Genet* 2002; 10:145–149.

¹² Gershoni-Baruch R, Shinawi M, Leah K, Badarnah K, Brik R: Familial Mediterranean fever: prevalence, penetrance and genetic drift. *Eur J Hum Genet* 2001; 9:634–637.

MEFV генот се наоѓа на хромозомот бр13.3, а кодира протеин наречен пирин или маренострин, прикажан само во неутрофилите, серозни клетки во перитонеумот и плеврални простори и во синовијалните клетки^{13,14}. Точната улога на протеинот се уште не е позната, но се знае дека има одреден ефект врз контрола на воспалението, веројатно преку инхибиција на C5a од комплементот и IL-8¹⁵.

1.1. ЕТИОЛОГИЈА НА БОЛЕСТА

Фамилјарна медитеранската треска е една од најчестите системски инфламаторни болести. Фамилјарно медитеранската треска е генетска болест која најчесто се јавува кај лица до 20 години. Болеста е генетски наследна но доколку се третира правилно и навреме прогнозата е позитивна.

Симптоми кои се карактеристични и најчести за Фамилјарна медитеранската треска се повторувачки епизоди на фебрилност, абдоменална болка, артритис, перикардална болка, секундарна амилоидоза. Појавата на Фамилјарна медитеранската треска е поврзана со мутација на MEFV (mediterranean fever) генот.

MEFV генот содржи протеин наречен пирин кој е одговорен за регулација за воспалителните реакции кои се случуваат во телото. Без протеинот пирин, инфламаторните реакции можат да растат без контрола.

Фамилјарна медитеранската треска е многу важно да се дијагностицира и третира на време. Доколку не се третира на време болеста носи ризик за појава на сериозни компликации. Најчести компликации се ренална инсуфициенција проследена со амилоидоза.

Доколку дојде до ренална инсуфициенција кај пациентот доаѓа до појава на намалено излучување на урина. Амилоидозата е болест која настанува со создавање и таложување на амилоид. Амилоид е протеин кој предизвикува оштетување на органите и органските системи. Тој може да влијае на бубрезите, срцето, слезината, нервите. Постојат три типа на амилоидоза: примарна

¹³ Haghghat M, Derakhshan A, Karamifar H. Shiraz E Medical Journal. 2006; Vol. 7, No. 2.

¹⁴ Kastner DL. Familial Mediterranean fever: the genetics of inflammation. Hospital Practice. 1998 April 15:131-58.

¹⁵ Kubik NJ 3rd, Katz JD. Familial Mediterranean Fever. Am J Orthop. 2000 Jul; 29(7):553-5

амилоидоза, секундарна амилоидоза и наследна амилоидоза. Секундарната амилоидоза е една од најчестите и потешки компликации кои може да се јават кај фамилијарна медитеранската треска доколку болеста не се открие на време и не се третира правилно.

Фамилијарна медитеранската треска е наследна болест и се докажува со генетска анализа и најчесто добиениот резултат е со мутација на двата алела на MEFV генот. Но, постојат и комплицирани и двосмислени ситуации каде се јавуваат нетипични клинички симптоми. Постојат случаи каде има мутација само на едниот алел на MEFV (mediterranean fever) генот односно хетерозигот како што е и нашиот случај а сепак да има појава на клинички симптоми.

1.2. КЛИНИЧКА СЛИКА

Фамилијарна медитеранска треска клинички се манифестира со рекурентни самолимитирачки фебрилни напади и симптоми кои ги пратат значајно покачени параметри за инфламација: седиментација на еритроцити , С реактивен протеин , серумски амилоид А, леукоцити, фибриноген, бета 2 микроглобулин.

Болеста се манифестира со следниве клинички симптоми се :

Зголемена телесна температура која може да биде и до 38-40 ° и е еден од најчестите симптоми, перитонитис, артритис кој најчесто е без деструкција на зглобовите и плевритис кој се јавува кај една третина од пациентите.

Не толку чести симптоми кои се јавуваат кај фамилијарна медитеранска треска се: перикардитис кој се јавува кај 1% од пациентите , едем на скротума, исип , миалгија.

Доминантен симптом е перитонитис кој се јавува кај поголем број на пациентите. Тој најчесто ја имитира сликата односно дава лажни симптоми на акутен абдомен и е најчеста причина за непотребна хирушка интервенција.

Повторливоста на фебрилните епизоди е варијабилна и не е познато кој е всушност тригерот. Од многубројните литературни податоци може да се издвои стресот како еден од поттикнувачките фактори, потоа разни инфекции, менструален циклус и други состојби на организмот.

Дерматолошките промени се манифестираат како унилатерални промени, под колено обично се проследени со едем и осетливост. Овие промени се лечат спонтано. Овие промени се манифестираат во епизоди и е видливи кој околу 50 % од пациентите.

Фамилијарната медитеранска треска може да се манифестира и со други клинички симптоми : инфламаторна болест на малите жлезди, пролангирана абдоменална миалгија, опстипација, фибромиалгија, тестикуларна торзија, едем на скротума.

Првиот напад на болеста обично се јавува пред 20 година од животот(кај 85-90% случаеви). Повторувањето на нападите варира од еднаш во неделата до 4 пати на секои 5-10 години.

Најтешка компликација на болеста е прогресивна секундарна амилоидоза А, бидејќи поголем број на пациенти се во висок ризик за развој на ренална инсуфициенција.

Доколку се земе во предвид лечењето со колхицин кој може да ја превенира амилоидозата кај Фамилијарна медитеранска треска, тогаш се оправдува генетскиот скрининг кај популација со висока инциденца.

1.3. ФАМИЛИЈАРНА МЕДИТЕРАНСКА ТРЕСКА

Клинички се опишани 3 фенотипа на фамилијарна медитеранска треска:

ТИП 1

- Најчести повторувања на фебрилни епизоди
- Peritonitis
- Pleuritis- со епизоди на perikarditis
- Meningitis

ТИП 2

-појава на амилоидоза (најтешка компликација), практично прва манифестација на болеста кај асимптоматските пациенти.

ТИП 3

-скриен хомозигот или комплексен хетерозигот, каде нема симптоми на болеста, а детектирана е мутација на генот MEFV.

1.4. ЛАБОРАТОРИСКИ АНАЛИЗИ

Лабораториските анализи се многу важни за поставување на самата дијагноза. Освен генетската анализа потребни се и биохемиски анализи за потврда на присуство на воспалителни процеси. Параметри кои се испитуваат се :

- седиментација на еритроцити,
- С реактивен протеин,
- серумски амилоид А,
- леукоцити,
- фибриноген,
- бета 2 микроглобулин.
- утринска урина

На тој начин се прави проценка на степенот на инфламација. Урината се испитува за да се докаже присуство на протеини и евентуално присуство на еритроцити.

Овие тестови се повторуваат и откако ќе се смират симптомите и ќе се нормализира состојбата на пациентот. Најчесто вредностите се враќаат во нормала или се благо покачени.

Кај урината особено се внимава да не дојде до покачување на протеините. Покачување на нивото на протеините во тек на нападите во урина се нормални.

Доколку дојде до покачено ниво на протеини во урината и после смирување на состојбата на пациентот тоа може да биде знак за присуство на амилоидоза.

Намалено ниво на албумините и значаен пораст на фибриногенот, β_2 и α_2 глобулините, липопротеините се детектираат во текот на разни фази на Фамилијарна медитеранска треска. Покачени се во текот на нападот на Фамилијарна медитеранска треска, а значително зголемени во тек на прогресија на амилоидоза.

1.5. ПОСТАВУВАЊЕ НА ДИЈАГНОЗА

Поставувањето на дијагноза за Фамилијарна медитеранска треска е комплексно во смисла дека претходно се прават лабораториски анализи поврзани со клиничките симптоми и после тоа се прави генетската анализа за потврда на присуство на мутацијата на генот MEFV. Постојат повеќе критериуми за поставување на дијагноза но во литературата најчесто се користени по Tel Hashomer.

Први публикувани критериуми во литературата се во 2009 година по Yalcinkaya-Ozen.

Направени се испитвања на 399 пациенти со Фамилијарна медитеранска треска и притоа контролната група била од 377 пациенти со периодични фебрилни состојби.

По Yalcinkaya-Ozen критериумите за Фамилијарна медитеранска треска се дијагностицирани со сензитивност од 87,4% и специфичност од 40,7%.

Од друга страна пак критериумите на Tel Hashomer и Livneh покажале сензитивност од 45,0% односно 77,3%. За специфичност спроед Tel Hashomer 97,2% и Livneh 41,1%,покажале поголема специфичност за разлика од Yalcinkaya-Ozen.²⁵

- покачена температура $>38^{\circ}$ трае 6-72h > 3 атака
- абдоменална болка трае 6-72h > 3 атака
- артритис трае 6-72h > 3 атака
- позитивна фамилијарна историја- докажано присуство на Фамилијарна медитеранска треска

Има голем број на пациенти со атипични симптоми или отсуство на симптоми, вклучувајќи и мали деца. Во тој случај е од големо значење генетската анализа како диференцијален дијагностички тест.

²⁵ DE, Performance of Different Diagnostic Criteria Familial Mediterranean Fever in Children with Periodic Fevers: Results from a Multicenter International Registry J Rheumatol,2015

Поставувањето на дијагноза е јасна доколку постои типична клиничка слика и потврдена мутација на двата гена на MEFV.

Но доколку се јават нетипични симптоми се отежнува поставувањето на дијагноза и од особено значење е внимателно да се разгледаат сите лабораториски испитувања кои се направени.

Се разгледува можноста за присуство на Фамилијарна медитеранска треска после три последователни напади на болеста. Се прави детална анамнеза во која се вклучува земање на податоци за етничко потекло, како и податоци за постоење на роднини со исти или слични симптоми или присуство на бубрежна инсуфициенција.

Потребно е да се опише детално секој напад на болеста, појавата и текот, времетраењето на самите симптоми. Се прави внимателна опсервација на пациентот од страна на самиот доктор, вклучен е и физички преглед на пациентот. За да се дефинира се прават и лабораториски анализи кои потврдуват присуство на инфламација: седиментација на еритроцити , С реактивен протеин, серумски амилоид А, леукоцити , фибриноген, бета 2 микроглобулин и утринска урина.

1.6. ТЕРАПИЈА

Фамилијарна медитеранската треска е генетска болест која неможе да се излечи, но може да се третира и во тој случај би бил позитивен исходот ²⁵. Се третира доживотно со колхицин. Само на тој начин може да се превенира болеста и да се намалат нападите како и да се превенира прогресија на секундарна амилоидоза.

Колхицинот е одобрен во 2009 година од страна на FDA за лечење на Фамилијарна медитеранска треска во Америка.

Биолошката цел на колхицинот е тубулинот кој е протеин кој влегува во составот на микротубулите. Ја блокира полимеризацијата тубулинот интерферирајќи со миграцијата на леукоцитите и дегранулација.

Колхицинот е трициклички алкалоид кој се користи за лечење на ГИХТ. Тој ги намалува леукоцитите и ја намалува фагоцитозата во текот на инфламаторниот одговор. Превенира развој на амилоидоза и ја намалува протинуријата.

Дозирањето е во зависност од возраста, а самите дози се препорачани од FDA. Се препорачува да се почне со мала доза, да се провери активноста на болеста. Доколку нема позитивен одговор се зголемува дозата.

Во случај да има резистенција на колхицин се вклучува антагонист на IL-1. Кај колхицин резистентни пациенти се користи и друга терапија, се употребуваат антагонист на IL-1, TNF- α , α -interferon.

²⁵ DE, Performance of Different Diagnostic Criteria Familial Mediterranean Fever in Children with Periodic Fevers: Results from a Multicenter International Registry J Rheumatol, 2015

2. Цел

Целта на овој труд е да се прикаже случај со необично наследување на болеста Фамилијарна медитеранска треска, како и да се насочи нашето внимание кон оваа болест која во Македонија би можела да биде релативно често присутна, имајќи го предвид мешањето со Турскиот народ на овие простори во минатото. Случување на бракови од мешовит карактер со едни од народите носители на гените е една од целите со кои што сакаме да докажеме дека може да се наследи овој ген.

3. ПРИКАЗ НА СЛУЧАЈ

Девојче на возраст 10 години примено на Клиниката за педијатрија во Скопје субфебрилно, со стабилни витални параметри и болка во левата нога и дискретен оток на зглобовите на нозете, во придружба со уртикариелен осип на екстремитетите. За време на нејзиниот 13-дневен престој во Клиниката, се повторува подигнување на телесната температура до 41°C придружена со треска и осип. Беа спроведени бројни лабораториски испитувања и консултации со специјалисти од различни области. Во недостаток на друго објаснување беше побарано генетско испитување за фамилијарна медитеранска треска (ФМФ).

Присуство на хетерозиготна E148Q мутација беше потврдено со генетски тест, а истата мутација беше откриена и кај татко. Според критериумите на Tel Hashomer ²⁵(Табела 1) (еден голем - моноартритис, еден мал – позитивно одговараат на колхицин, а уште пет - годишна возраст ≤ 20 , тешки напади, спонтана ремисија, напад-слободен период, како и повремени инфламаторни епизоди со абнормален висок број на леукоцити / или седиментација), беше поставена дијагноза: Фамилијарна медитеранска треска. Терапијата на избор, колхицин, е пропишана орално во доза од 1,5 mg / ден, што доведе до потполно повлекување на симптомите следните два дена по започнување на третманот. Закажани се месечни контроли.

²⁵ DE, Performance of Different Diagnostic Criteria Familial Mediterranean Fever in Children with Periodic Fevers: Results from a Multicenter International Registry J Rheumatol, 2015

Табела 1. Критериуми по Tel Hashomer

Table 1. Criteria for Tel Hashomer

Главни критериуми	Минорни критериуми	Критериуми за поддршка
<p>Типичен напад</p> <ul style="list-style-type: none"> • перитонитис • унилатерален плевритис • моноартритис 	<p>Некомплетен напад во едно или повеќе од следните места :</p> <ul style="list-style-type: none"> • абдомен • гради • зглоб • напорна болка во ногата • Позитивен одговор на колхицин 	<ul style="list-style-type: none"> • Фамилијарна историја на ФМТ • Адекватно етничко потекло • Почеток на болеста на возраст помала од 20 години • Тешки напади • Спонтани ремисии • Период без симптоми • Минлив инфламаторен одговор проследен со повеќе од еден резултат покачени вредности на Le, E_r, SAA, SE. • Епизодна протеинуриа. • Крвна линија на родителите.

* За дијагностицирање на ФМТ се бара :
 ≥ 1 главен критериум, или ≥ 2 минорни критериуми, или
 1 минорен или ≥ 5 критериуми за поддршка, или
 1 минорен или ≥ 4 од првите 5 критериуми за поддршка.

Типичните напади се дефинирани како болка која трае кратко (од 12 часа до 3 дена), се повторуваат (≥ 3 некои од нив) и се придружени со висока температура ($\geq 38^{\circ}\text{C}$).

Некомплетните напади се дефинирани напади на болка слична на типичните, освен:

- Температурата не расте
- Нападот трае подолго или пократко во споредба со типичниот напад
- За време на абдоменалната болка нема појава на перитонитис
- Абдоменалните напади се локализирани
- Артритисот е локализиран на нетипични зглобови

4. МАТЕРИЈАЛ

За изработката на овој труд е користена крв од пациент кој е претходно хоспитализиран на Клиниката за детски болести. Потребен матрејал за изработка на оваа генетска анализа е венска крв со КЗ ЕДТА. КЗ ЕДТА ја спречува коагулацијата на крвта и не интерферира во амплификацијата на фрагментите од интерес. Примерокот за анализа го добиваме со внимателна венепункција. Потребно ни е 3 ml полна крв, а времето на земање на примерокот за генетското испитување не е важно и може да е во било кој дел од денот.

5. МЕТОДИ НА ИСТРАЖУВАЧКАТА РАБОТА

Откривањето на 12 најчестите MEFV мутации се врши со користење на комерцијални ФМТ StripA комплет (ViennaLab, Виена, Австрија), со помош на техника за реверзна хибридизација.

Самата метода односно постапка содржи неколку фази :

1. Изолација на геномска ДНК
2. Полимеразно верижна реакција ПВР
3. Електрофореза
4. Метода на реверзна хибридизација
5. Читање на резултати

5.1. ИЗОЛАЦИЈАТА НА ГЕНОМСКАТА ДНК

За изолација на ДНК се користи венска крв со КЗ ЕДТА и автоматизиран систем за изолација на принцип на магнетни партикли специјални за ДНК.



Слика1. Апарат за изолација на ДНК

Figure 1. Apparatus for isolation of DNA

5.2. ПОЛИМЕРАЗНО ВЕРИЖНА РЕАКЦИЈА ПВР

ПВР-претставува метода со чија помош може да се направат копии од геномската секвенца од интерес за понатамошно испитување.

Полимеразно верижна реакција е техника за ин-витро амплификација на специфични ДНК фрагменти при што се користат прајмери односно започнувачи кои ги ограничуваат фрагментите.

Со оваа метода може од мали колочини на ДНК да се добијат многу копии од генот од интерес. Со промена на температурата за одредено време во термосајклер настанува ПВР-реакцијата и се добиваат ампликони (продукти). За кратко време настанува денатурација на двоверижната ДНК на температура од 94 степени, потоа настанува анилирање (прилепување) на прајмерите на температура на 58 степени и на крај доаѓа до елонгација (издолжување) на нишката на температура од 72 степени.

Во фазата на денатуризација на ДНК на 94 степени се раскинуваат врските на двоверижната ДНК и се добиваат едноверижни нишки.

Анилирањето е прилепување на прајмерите со комплементарни секвенци од матричните ДНК нишки. Постојано доаѓа до формирање и раскинување на јоснските врски меѓу едноверижните прајмери (започнувачи) и едноверижната матрицата. Во тек на издолжувањето на прајмерите полимеразата на својата оптимална температура од 72 степени ја издолжува секвенцата на прајмерите преку синтеза на нова ДНК нишка која е комплементарна на секоја матрична молекула а на тој начин се дуплира бројот на копии на целиот регион.

Издолжувањето се случува на температура од 72 степени каде прајмерите преку синтеза на нова ДНК која е комплементарна на матичната се дуплираат односно се прават копии од генот од интерес.

ТАК полимераза е ензим кој е изолирана од *thermus aquaticus*.

ТАК полимераза стои на температура од -18 степени за да не дојде до губење на нејзината активност, односно се вади и после употреба се враќа во фрижидер.

5.3. ПРОТОКОЛ ЗА ПВР

- 15µl ПВР микс (нуклеотиди+MgCl+пуфер кој ја одржува средината)
- 5 µl разредена так полимераза (1 µl так полимераза+4 µl разредувач)
- 5 µl ДНК примерок (концентрација 5-40 µg/ml)

5.4. ПРОТОКОЛ ЗА АМПЛИФИКАЦИЈА

Протоколот за амплификација се одвива во термосајклер кој е програмиран според упатство дадено од производителот за дадената анализа. Во тејмосајклерот се одвива ПВР- реакцијата.

Еден циклус во термосајклерот изгледа вака:

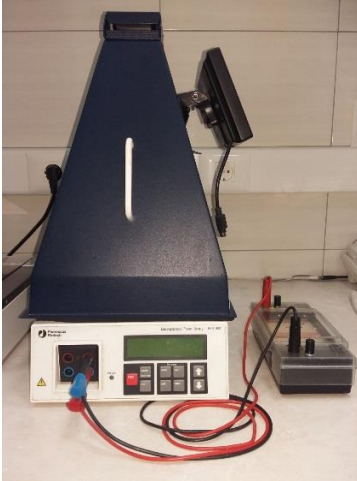
- 94°C/2 мин. денатурација на висока температура
 - 94°C/15 сек.
- 58°C/30 сек. анилирање со помош на прајмери кои ги има во миксот
- 72 °C/30 елонгација
 - Се повторува 30 пати односно 30 циклуси.

5.5. ЕЛЕКТРОФОРЕЗА

Со помош на електрофореза се проверуваат ПВР продуктите (анпликони) на транслуминатор со UV светлина и се гледа дали имаме успешна ПВР реакција.

Се подготвува 2% агарозен гел со додавање на ~ 5 µl етидиум бромид.

Се загрева до вриење агарозата, се додава етидиум бромид и се лее во кадичка за електрофореза во која претходно се ставени чешлиња за правење бунарчиња. По ладењето и стврднувањето на гелот се вадат чешлињата и тој се става во кадичка за електрофореза. Во секое од бунарчињата се аплицира од соодветниот ПВР примерок. ПВР примерокот пред аплицирање во гелот се меша со еднаква количина на loading baffer (кој дава обојување и тежина). Електрофорезата тече 15 минути.



Слика 2. апарат за електрофореза

Figure 2. Apparatus for electrophoresis

5.6. МЕТОДА НА РЕВЕРЗНА ХИБРИДИЗАЦИЈА

Хибридизацијата претставува комплементарно поврзување на едноверижната ДНК од ПВР продуктот со кратки олигонуклеотидни проби нанесени на нитроцелулозни ленти (стрипови).

За реверзна хибридизација секогаш треба да се одржуваат стрингентни услови, кои доколку не се одржуваат ќе дојде до амплифицирање на неспецифични продукти или ќе недостасува некој продукт. Стрингентните услови ги дефинираат времето и температурата.

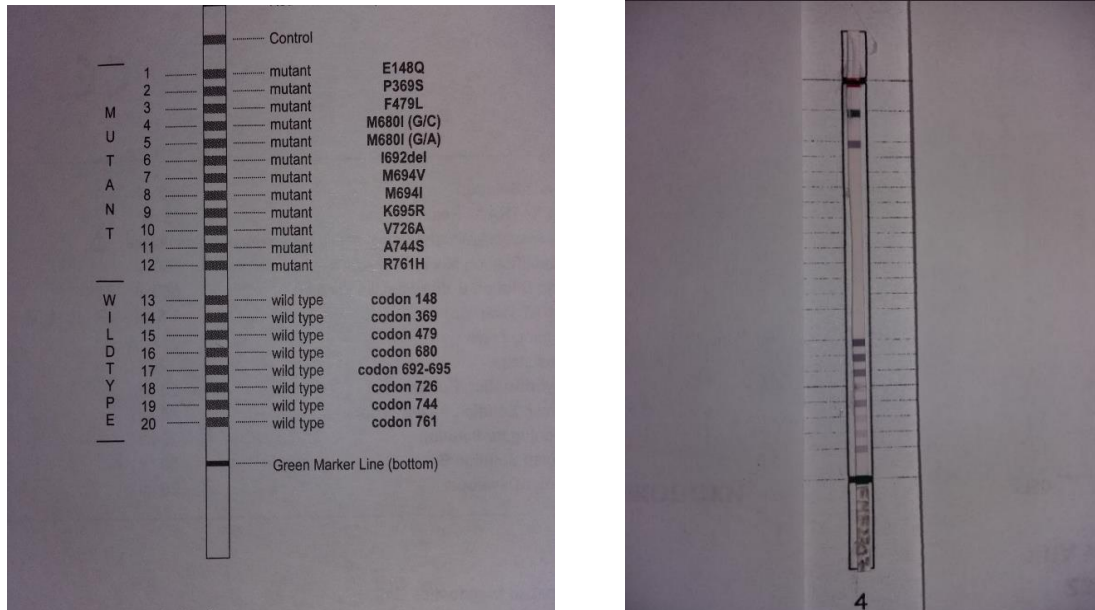
5.7. ПРОТОКОЛ ЗА ХИБРИДИЗАЦИЈА

- Почнуваме со обележување на лентите за хибридизација.
- Во плочките се става раствор, натриум хидрооксид, за денатурација на ДНК која е двоверижна да дојде до раскинување на врските и да настане едноверижна. Се додава иста количина ДНК и се меша нежно со типсот. Пипетирањето обично се прави на агол од бунарот за да не се разлее растворот. Стои 5 минути на собна температура.
- По денатуирањето се става раствор за хибридизација кој е претходно загреан на 45 степени.
- Се инкубира во водена бања на 45 степени со благо мешање 30 минути.
- По 30 минути инкубација се отстранува растворот со вакуум аспирација или со декантирање.
- Потоа се плакне со wash solution A кој е претходно загреан на 45 степени, се меша и се повторува постапката уште еднаш но овој пат не се фрла течноста, се инкубира 15 минути на 45 степени.
- Се отстранува течноста (пуферот) со декантирање.
- Во стрипот се додава коњугатот кој е ензим стрептавидин алкална фосфатаза, и се инкубира на собна температура 15 минути.

- Прајмерите се биотилизирани, содржат биотин кој се врзува со стрептивидинот и се добива комплекс биотин стрептавидин на собна температура.
- Потоа се плакне со wash solution B, со што се отстранува коњугатот, два пати по 5 минути.
- Последната фаза е бојење на стриповите со супстрат (NBT БОЈА) која го обојува комплексот биотин стрептавидин.
- Плочката се затвара со алуминиумска хартија (на темно), се меша 15 минути на собна температура.
- На крај се плакнат стриповите со вода.
- По завршената хибридизација се добиваат стрипови со виолетово обоени ленти на местата каде имаа позитивна реакција.

6. ЧИТАЊЕ НА РЕЗУЛТАТИ

Плочките се читаат со соодветни колектори читачи.



Слика 3. колектор читач

Figure 3. collector reader

На слика бр.3 е прикажан колектор со кој се споредува добиениот резултат од пациентот

- Ако добиеме примерок (стрип) со само нормална виолетова линија за некој мутиран ген тогаш се зборува за нормален генотип.
- Ако добиеме нормална и мутирана линија на стрипот за истата мутација тогаш имаме хетерозигптен генотип.
- Ако добиеме само мутирана линија на стрипт а ја нема нормалната варијанта на истата мутација тогаш имаме мутиран генотип.

После направената споредба со колекторот читач потврдено е дека пациентот е хетерозигот (носител на еден нормален и еден мутиран ген). Во нашиот случај пациентот е носител на хетерозиготна форма на MEFV во E148Q.

7. ДИСКУСИЈА

Во разгледувањето на спектарот и пенетрацијата на различни мутации на генот MEFV, се чини дека се идентификувани три мутантни жаришта, во кодоните 148, 680, и 694¹⁶. Повеќе од 140 мутации на MEFV се до сега откриени во светот¹⁷. Сепак, очигледно е дека само пет од нив се на глобално ниво одговорени за поголемиот дел (околу 70%) од случаите со ФМФ, имено мутациите V726A, M694V, M694I, M680I и E148Q^{17,18,19}. И покрај очигледниот напредок во последната деценија во воспоставувањето молекуларните тестови за рутинска употреба, околу 20% од пациентите со ФМТ остануваат без забележлива мутација во генот на MEFV и дијагнозата се уште се потпира на клинички критериуми. Друга важна карактеристика на болеста, е разновидноста на симптомите и нивната различна тежина кај различни пациенти. Имено, оваа висока хетерогеност не е секогаш во корелација со типот на мутација, иако некои мутации се верува дека почесто се поврзани со потешка презентација на болеста, додека други мутации се поврзани со полесна клиничка слика, односно клиничката презентација на одредени генотипови во хомозиготна, хетерозиготна или во комбинација хетерозиготни пациенти^{20,21,22,23,24,25}. Ова укажува на потенцијалот на различни фактори за модификација, како што се пол, возраст, но и други непознати. Очигледно, сеуште неидентификувани фактори од околината влијаат на клиничка манифестација на болеста и не може да се исклучат.

¹⁶ Livneh A, Langevitz P; Diagnostic and treatment concerns in familial Mediterranean fever. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2000 Sep;14(3):477-98.

¹⁷ Matzner, Y, Partridge RE, Levy M, et al. Diminished activity of a chemotactic inhibitor in synovial fluids from patients with familial Mediterranean fever. *Blood* 1984 Mar; 63(3):629-33.

¹⁸ Mijatovic V, Hompes PG, Wouters MG. Familial Mediterranean fever and its implications for fertility and pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003 Jun 10;108(2):171-6.

¹⁹ Pras M. Familial Mediterranean fever: from the clinical syndrome to the cloning of the pyrin gene. *Scand J Rheumatol*. 1998;27(2):92-7.

²⁰ Shohat M, Magal N, Shohat T et al: Phenotype –genotype correlation in familial Mediterranean fever: evidence for an association between Met694Val and amyloidosis. *Eur J Hum Genet* 1999; 7:287–292.

²¹ Shinawi M, Brik R, Berant M, Kasinetz L, Gershoni-Baruch R: Familial Mediterranean fever: high gene frequency and heterogeneous disease among an Israeli-Arab population. *J Rheumatol* 2000; 27:1492–1495.

²² Tchernitchko D, Legendre M, Cazeneuve C, Delahaye A, Niel F, Amselem S.

²³ Touitou I. The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations. *Eur J Hum Genet* 2001; 9:473-483.

²⁴ Yepiskoposyan L and Harutyunyan A. Population genetics of familial Mediterranean fever: a review *Eur J Hum Genet* 2007; 15:911-9162

²⁵ DE, Performance of Different Diagnostic Criteria Familial Mediterranean Fever in Children with Periodic Fevers: Results from a Multicenter International Registry *J Rheumatol*,2015

Иако болеста класично се наследува рецесивно, опишани се некои атипични случаи на автосомно доминантно наследување. Ова сознание беше потврдено во две одделни семејства, едното со Ашкенази, а другото со грузиско потекло. Со анализирање на MEFV во 4 последователни генерации на членови на семејствата, беше потврдено дека и во двата случаи основната мутација одговорна за необичниот начин на наследување беше мутацијата E148Q (OMIM 607.108,0005), присутна во хетерозиготна состојба. Опишаниот пациент може да биде уште еден случај во поддршка на необичното доминантно наследување, од хетерозиготна состојба за мутација E148Q како единствен позитивен наод од генотипизацијата на 12 најчести MEFV мутации.

8. ЗАКЛУЧОК

- ФМФ се јавува кај етнички групи од средоземното море Евреи (1/250-1000), Ерменци (1/500), Турци (1/1000), Арапи (1/2600), со преваленца 1/1000
- Сиптомите се јавуваат пред дваесетата година од животот
- Се наследува автосомно рецесивно
- Една од најчестите инфламаторни болести
- Фебрилни епизоди пратени со покачени вредности на параметри поврзани со акутни воспалителни процеси
- Позитивна фамилијарна анамнеза
- Присуство на мутација на генот MEFV
- Се третира со терапија-колхицин дозирана според возраста на пациентот
- Рано дијагностицирање поради превенција на акутен напад на болеста и амилоидоза која е најтешка компликација од болеста

9. REFERENCES

1. Bakkaloglu A. Familial Mediterranean fever. *Pediatr Nephrol.* 2003 Sep; 18(9):583-9. Ben-Chetrit E, Levy M; Familial Mediterranean fever. *The Lancet* 1998; Vol 351:659-64.
2. Ben-Chetrit E, Levy M; Familial Mediterranean fever. *The Lancet* 1998; Vol 351:659-64.
3. Booth DR, Gilmore JD, Lachmann HJ et al: The genetic basis of autosomal dominant familial Mediterranean fever. *Q J Med* 2000; 93:217– 221.
4. Brik R, Shinawi M, Kasinetz L, Gershoni-Baruch R: The musculoskeletal manifestations of familial Mediterranean fever in children genetically diagnosed with the disease. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1416–1419.
5. Cazeneuve C, Sarkisian T, Pecheux C et al: MEFV-gene analysis in Armenians patients with FMF: diagnostic value, unfavorable renal prognosis of the M694V homozygous genotype, genetic and therapeutic implications. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 88– 97.
6. Cazeneuve C, Ajrapetyan H, Papin S et al: Identification of MEFV-independent modifying genetic factors for familial Mediterranean fever. *Am J Hum Genet* 2000; 67:1136–1143.
7. Dewalle M, Domingo C, Rozembaum M et al: Phenotypegenotype correlation in Jewish patients suffering from familial Mediterranean fever (FMF). *Eur J Hum Genet* 1998; 6:95–97.
8. El-Shanti HE. Familial Mediterranean Fever. *Saudi Med J.* 2001;22(2):104-9.
9. Gedalia A. Familial Mediterranean fever in Nelson, *Text book of pediatrics*, 17th ed. W. B. Saunders Company 2004:821-2.
10. Gershoni-Baruch R, Brik R, Zacks N, Shinawi M, Lidar M, Livneh A: The contribution of genotypes at the MEFV and SAA1 loci to amyloidosis and disease severity in patients with familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1149– 1155.
11. Gershoni-Baruch R, Brik R, Shinawi M, Livneh A: The differential contribution of MEFV mutant alleles to the clinical profile of familial Mediterranean fever. *Eur J Hum Genet* 2002; 10:145–149.
12. Gershoni-Baruch R, Shinawi M, Leah K, Badarnah K, Brik R: Familial Mediterranean fever: prevalence, penetrance and genetic drift. *Eur J Hum Genet* 2001; 9:634–637.
13. Haghighat M, Derakhshan A, Karamifar H. *Shiraz E Medical Journal.* 2006; Vol. 7, No. 2.
14. Kastner DL. Familial Mediterranean fever: the genetics of inflammation. *Hospital Practice.* 1998 April 15:131-58.

15. Kubik NJ 3rd, Katz JD. Familial Mediterranean Fever. *Am J Orthop*. 2000 Jul; 29(7):553-5
16. Livneh A, Langevitz P; Diagnostic and treatment concerns in familial Mediterranean fever. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2000 Sep;14(3):477-98.
17. Matzner, Y, Partridge RE, Levy M, et al. Diminished activity of a chemotactic inhibitor in synovial fluids from patients with familial Mediterranean fever. *Blood* 1984 Mar; 63(3):629-33.
18. Mijatovic V, Hompes PG, Wouters MG. Familial Mediterranean fever and its implications for fertility and pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003 Jun 10;108(2):171-6.
19. Pras M. Familial Mediterranean fever: from the clinical syndrome to the cloning of the pyrin gene. *Scand J Rheumatol*. 1998;27(2):92-7.
20. Shohat M, Magal N, Shohat T et al: Phenotype –genotype correlation in familial Mediterranean fever: evidence for an association between Met694Val and amyloidosis. *Eur J Hum Genet* 1999; 7:287–292.
21. Shinawi M, Brik R, Berant M, Kasinetz L, Gershoni-Baruch R: Familial Mediterranean fever: high gene frequency and heterogeneous disease among an Israeli-Arab population. *J Rheumatol* 2000; 27:1492–1495.
22. Tchernitchko D, Legendre M, Cazeneuve C, Delahaye A, Niel F, Amselem S.
23. Touitou I. The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations. *Eur J Hum Genet* 2001; 9:473-483.
24. Yepiskoposyan L and Harutyunyan A. Population genetics of familial Mediterranean fever: a review *Eur J Hum Genet* 2007; 15:911-9162
25. DE, Performance of Different Diagnostic Criteria Familial Mediterranean Fever in Children with Periodic Fevers: Results from a Multicenter International Registry *J Rheumatol*,2015

Драгица Близнаковска Станчев

ГЕНЕТСКО ДИЈАГНОСТИЦИРАЊЕ НА ФАМИЛИЈАРНА МЕДИТЕРАНСКА ТРЕСКА
– ПРИКАЗ НА СЛУЧАЈ ОД РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА

Универзитет “Гоце Делчев” – Штип