

اساس مولکولی و تشخیص قبل از تولد تالاسمی در جنوب شرق ایران، سال ۸۳ - ۱۳۸۱

مهرناز نارویی نژاد (M.Sc.) * پیمان عشقی (M.D.) **

فریبا سوادکوهی (M.Sc.) ***

ابراهیم میری مقدم (M.Sc.) *

سیروس زینلی (M.Sc.) ***

چکیده

سابقه و هدف: بتاتالاسمی شایع‌ترین اختلال تک‌ژنی در ایران می‌باشد فراوانی این ژن در مناطق مختلف کشور متفاوت است. استان سیستان و بلوچستان در جنوب شرق ایران با داشتن ۱۲۰۰ بیمار تالاسمی از جمله مناطقی است که این اختلال ارثی نه تنها به عنوان یک مشکل بهداشتی بلکه به صورت یک مشکل اجتماعی و اقتصادی در آن مطرح است. با توجه به مشکلاتی هم‌چون؛ فراوانی ژن بتاتالاسمی، تعدد ازدواج‌های فامیلی، عدم انجام آزمایشات قبل از ازدواج، تمایل به داشتن اولاد زیاد و وجود حاملگی‌های خواسته در بین خانواده‌های دارای فرزند تالاسمی، مرکز تشخیص قبل از تولد تالاسمی در خرداد ماه سال ۱۳۸۱ در این استان راه‌اندازی شد.

مواد و روش‌ها: مطالعه از نوع توصیفی بوده و از خرداد ۱۳۸۱ لغایت اسفند ۱۳۸۳، ۲۲۴ زوج مینور به مرکز تالاسمی زاهدان معرف شدند. پس از پذیرش زوجین اطلاعات دموگرافیک آن‌ها ثبت و از آن‌ها ۱۰ میلی‌لیتر خون بر روی ضدانعقاد EDTA (۰/۵ مولار) گرفته شد. DNA نمونه‌ها تخلیص و جهش‌های شایع ایران با روش (Amplification Refractory Mutation System) (ARMS/ PCR Refractory Mutation System) در آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در هفته ۱۲-۱۰ حاملگی از پرزهای جفتی نمونه‌برداری (CVS) شد و با دو روش مستقیم و غیرمستقیم به ارث بردن جهش در جنین مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: جهت ۹۹ زوج مرحله اول و برای ۱۲۵ زوج مرحله اول و دوم تشخیص قبل از تولد تالاسمی انجام شد. ۷۶/۸ درصد زوجین معرفی شده به این مرکز ساکن شهر بودند. ۸۸/۸ درصد متولد استان سیستان و بلوچستان که در این میان ۳۰/۸ درصد از قوم سیستانی و ۶۹/۲ درصد از قوم بلوچ بودند. در زمان مراجعه ۵۶/۷ درصد زوجین فرزند تالاسمی ماژور داشتند. ۸۷/۱ درصد زوجین وابستگی نسبی با یکدیگر داشتند و ۶۳/۸ درصد اهل سنت بودند. در بررسی‌های به‌عمل آمده بر روی ژن بتاگلوبین این زوجین، ۸۶/۷ درصد آن‌ها یکی از جهش‌های شایع در ایران را داشتند به‌طوریکه ۱-۵ IVS با ۷۶/۵ درصد فراوانی، شایع‌ترین جهش شناخته شده منطقه بود. در بررسی مولکولی ۱۲۵ نمونه پرز جفتی، ۲۰ درصد آن‌ها جنین ماژور تشخیص داده شد.

استنتاج: کثرت ازدواج‌های فامیلی باعث شده که هموزیگوتی بالایی در موتاسیون منطقه دیده شد با توجه به ترکیب جمعیتی این منطقه، این اولین استقبال اهل سنت از تشخیص قبل از تولد تالاسمی در کشور باشد، لذا راه‌اندازی مرکز تشخیص قبل از تولد تالاسمی با توجه به ساختارهای خاص فرهنگی و اجتماعی منطقه از اقدامات موثر در پیش‌گیری از تالاسمی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بتاتالاسمی، جهش، تشخیص قبل از تولد

* زاهدان: میدان مشاهیر - دانشکده پیراپزشکی
*** متخصص ژنتیک انسانی و عضو هیئت علمی انستیتو پاستور تهران

* مربی و عضو هیئت علمی گروه ایمنوهماتولوژی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان
** فوق تخصص خون و آنکولوژی اطفال و عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان
*** متخصص رادیولوژی و عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

E تاریخ دریافت: ۸۳/۷/۵

تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۳/۸/۱۹

تاریخ تصویب: ۸۴/۱۲/۵

مقدمه

بتاتالاسمی شایع ترین اختلال تک ژنی اتوزومال مغلوب در سرتاسر جهان محسوب می شود و ناشی از موتاسیون در ژن بتاگلوبین می باشد. بتاتالاسمی در سطح مولکولی بسیار هتروژن است به طوریکه تاکنون بیش از ۲۰۰ جهش از آن شناسایی شده است (۱).

ایران با داشتن حدود ۲۵۰۰۰ بیمار تالاسمی و سه میلیون ناقل از جمله مناطقی است که بتاتالاسمی به طور غیر معمول در آن شایع است فراوانی ژن بتاتالاسمی در مناطق مختلف ایران متفاوت گزارش شده است به طوریکه در استان های مجاور خلیج فارس و دریای مازندران فراوانی آن از ۱۰ درصد نیز بیش تر است (۲). سیستان و بلوچستان با حدود دو میلیون نفر جمعیت در جنوب شرق ایران، فراوانی ژن بتاتالاسمی در مناطق مختلف از آن ۱۰-۴ درصد متغیر است. این استان ۱۲۰۰ بیمار تالاسمی مازور دارد که به طور مرتب از خدمات بهداشتی و درمانی استفاده می نمایند (۳). تالاسمی نه تنها یک مشکل بهداشتی بلکه یک مشکل اقتصادی - اجتماعی در بسیاری از کشورهاست (۴). به منظور پیش گیری از موارد جدید تالاسمی استراتژی های متفاوتی مطرح شده است که از این میان می توان به غربالگری تالاسمی زوجین قبل از ازدواج، مشاوره ژنتیک و افزایش آگاهی زوجین در معرض خطر اشاره کرد. تشخیص قبل از تولد تالاسمی برای اولین بار از سال ۱۳۷۵ به عنوان یک روش موثر و کارآمد براساس نسبت زنجیره های الفا به بتا مطرح شد (۵). بعدا تشخیص بر مبنای آنالیز DNA مانند ساترن بلات^۱ و هیبریداسیون (۶)، دات بلات^۲، دات بلات معکوس^۳ (۸،۹) و ARMS-PCR^۴ با استفاده از پرایمرهای ال

اختصاصی (۱۰) مطرح شد. در ابتدا DNA جنین از سلول های مایع آمنیوتیک در هفته ۱۷-۱۵ حاملگی استخراج می شد ولی از سال ۱۹۸۴ نمونه های گرفته شده از پرزهای جفتی در هفته ۱۱-۹ حاملگی جانشین روش قبلی شد (۱۱) تشخیص قبل از تولد تالاسمی در ایران از سال ۱۳۷۲ امکان پذیر شد ولی از سال ۱۳۷۶ با توجه به وجود سقط درمانی به صورت قانونی شروع شد لذا با توجه به مسائل فرهنگی، اجتماعی خاص منطقه و افزایش موارد جدید تالاسمی در هر سال در این استان (۳) وزارت بهداشت و درمان و دانشگاه علوم پزشکی زاهدان را بر آن داشت که با راه اندازی مرکز تشخیص قبل از تولد تالاسمی در سال ۱۳۸۱ موارد جدید تالاسمی را کاهش دهد که در این مقاله نتایج حاصل از فعالیت، دو سال این مرکز ارائه می گردد.

مواد و روش ها

مطالعه از نوع توصیفی می باشد. نمونه های پژوهش ۲۲۴ زوج بوده که از خرداد ۱۳۸۱ لغایت اسفند ۱۳۸۳، به مرکز تالاسمی زاهدان معرفی شدند. زوجین معرفی شده افرادی بودند که پس از انجام آزمایشات اولیه CBC، HbA2، براساس مقادیر اندکس های MCV، MCH و مقدار HbA 2 در مراکز مشاوره قبل از ازدواج به عنوان ناقل تلقی شده بودند و یا افرادی بودند که فرزند مازور داشتند و مایل بودند که در حاملگی بعدی این مرکز سلامت جنین آن ها را قبل چهار ماهگی تشخیص دهد. در ابتدا مشخصات دموگرافیک افراد ثبت و ۱۰ میلی لیتر خون وریدی بر روی ضد انعقاد EDTA (۰/۵ مولار) از آن ها گرفته شد و تا زمان

1- Southern blotting

2- Dot Blot

3- Reverse Dot Blot

4- Amplification Refractory Mutation System

پلی مورفیسم آن‌ها می‌باشد. مرحله دوم تشخیص شامل نمونه‌برداری از پرزهای جفتی (CVS)، تخلیص DNA پرز و بررسی جهش‌های والدین در نمونه مورد نظر می‌باشد. لیست پرایمرهای مورد استفاده برای ARMS/ PCR عبارت بودند از: IVS 1-5, IVS 11-1, IVS 1-1, IVS 1-6, IVS 1-130, IVS 1-116, Ivs 1-110, IVS 11- 745, IVS 11- 705, CD 36/37, CD44, CD 39, CD22, CD30- 25 del, Fr- 8/9, 28, 88, Hbs

لیست پرایمرهای RFLP مورد استفاده عبارت بودند از:
AVA11/ B, Hinf 1/B, Hinc 11/3YB
Hin 11/5 YB

یافته‌ها

از ۲۴۴ زوج مینور معرفی شده به این مرکز برای ۹۹ زوج مرحله اول و برای ۱۲۵ زوج مرحله اول و دوم تشخیص قبل از تولد تالاسمی انجام شد. ۷۶/۸ درصد زوجین معرفی شده به این مرکز ساکن شهر و ۲۳/۲ درصد ساکن روستا بودند. ۸۸/۸ درصد زوجین متولد استان سیستان و بلوچستان بودند به‌طوریکه ۳۰/۸ درصد این زوجین از قوم سیستانی و ۶۹/۲ درصد از قوم بلوچ بودند.

۳۲/۶ درصد زوجین مراجعه‌کننده فاقد فرزند، ۵۶/۷ درصد دارای فرزند تالاسمی مازور، ۸/۹ درصد دارای فرزند مینور و ۱/۸ درصد فرزند سالم داشتند. در خانواده‌های دارای فرزند تالاسمی؛ ۸۸/۲ درصد یک فرزند تالاسمی، ۱۰/۲ درصد دو فرزند و ۱/۶ درصد سه فرزند تالاسمی داشتند. جدول شماره ۱ تعداد فرزندان زوجین را نشان می‌دهد. ۸۷/۱ درصد زوجین وابستگی نسبی با یکدیگر داشتند و ۶۳/۸ زوجین از نظر مذهبی اهل سنت و ۳۶/۲ درصد اهل تشیع بودند. از بررسی به عمل آمده بر روی ژن بتاگلوین زوجین مراجعه‌کننده به این مرکز ۸۶/۷ درصد آن‌ها یکی از جهش‌های شایع ایران را داشتند.

تخلیص DNA با استفاده از اسپکتروفتومتر در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ nm کمیت و کیفیت DNA مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مرکز از روش مستقیم ARMS/PCR^۱ که یک روش نسبتاً ساده و سریع جهت تعیین جهش‌های نقطه‌ای، حذف و اضافه شدن چند نوکلئوتید و چند شکلی‌ها^۲ می‌باشد (۱۲) و هم‌چنین روش غیرمستقیم RFLP، استفاده می‌شود. در روش ARMS/ PCR از ۲۰ پرایمر ساخته شده کمپانی Genset استفاده شد. ژنومیک DNA نمونه‌ها، توسط DNA Taq پلی‌مراز (آمریکا) تکثیر یافت. مخلوط واکنش PCR در هر میکروتیوب ۲۵ میکرولیتر شامل: بافرتریس (PH:8.3) ۱۰ میلی‌مولار، کلرید پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار و کلرید منیزیم ۱/۵ میلی‌مولار و مخلوط dNTPs ۲۰۰ میلی‌مولار، اسپرمیدین ۰/۱ درصد ۰/۵ واحد آنزیم Taq DNA پلیمر از ۰/۱ میکروگرم از هر کدام از پرایمرها و ۰/۵ میکروگرم از DNA بود.

سپس نمونه‌ها در دستگاه‌های توموسیکلرگرادینت مدل AG اپندرف (آلمان) با برنامه ذیل تکثیر یافتند. دمای اولیه: ۹۴ به مدت ۲ دقیقه، دمای و اسرشت: ۹۴ درجه یک دقیقه دمای اتصال: ۶۸ +۲ یک دقیقه، دمای تکثیر: ۷۲ درجه یک دقیقه و این چرخه بین ۳۰-۲۷ مرتبه تکرار شد. پس از انجام PCR و ۲۰ میکرولیتر از محصول تکثیر یافته با ۵ میکرولیتر برموفنل ۰/۵ درصد مخلوط شده و بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی ۰/۵ میکروگرم در هر میلی‌لیتر اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد. پس از الکتروفورز در ولتاژ ۸۰ ژل در زیر نور ماورای بنفش (UV) مورد بررسی قرار گرفت (۱۲، ۱۳).

مرحله اول تشخیص قبل از تولد تالاسمی شامل تعیین موتاسیون والدین و هم‌چنین الگوی گویای نواحی

1- Amplification refractory mutation system
2- Polymorphism

۱(۰/۲)	Codon 36/37(-T)
۱(۰/۲)	IVS 11- 745
۵۸ (۱۳/۳)	Unknown
۴۳۵ (۱۰۰)	جمع

جدول شماره ۱: توزیع فراوانی فرزندان زوجین مراجعه کننده به مرکز تشخیص قبل از تولد تالاسمی زاهدان، سال ۸۳ - ۱۳۸۱

بحث

تالاسمی در سطح مولکولی از هتروژنی بالایی برخوردار است و جهش‌های متعددی برای آن گزارش شده است. ولی علی‌رغم این هتروژنی، هر جمعیتی الگوی جهشی خاصی دارد به‌طوریکه ۱۰-۵ جهش، شایع‌ترین جهش‌های هر منطقه را تشکیل می‌دهد (۱۶). نتایج حاصل از این مطالعه حاکی از فراوانی ۷۷ درصدی جهش IVS1-5(G-C) در منطقه می‌باشد. در ایران هتروژنی بالایی از موتاسیون‌های ژن بتا در مناطق مختلف گزارش شده است ولی جهش غالب ایران IVS11-1 است و فراوانی آن در شمال کشور بیش‌تر از جنوب و هر چه به سمت جنوب رفته فراوانی جهت IVS1-5 بیش‌تر می‌شود. فراوانی جهش IVS11-1 در شمال کشور در حد ۶۸/۷۵ درصد گزارش شده است (۱۸، ۱۷). مطالعه انجام شده در جنوب غربی ایران، IVS 11-1 را با ۳۱ درصد شایع‌ترین جهش و سپس IVS1-6 با ۱۵ درصد دومین شایع‌ترین جهش گزارش شده است (۱۹). مطالعه انجام شده در بوشهر بر روی ۱۰۴ بیمار تالاسمی، del-25 را شایع‌ترین موتاسیون منطقه گزارش کرده است (۲۰). مطالعه انجام شده در استان هرمزگان نشان می‌دهد، موتاسیون‌های IVS 1-1، IVS 1-5، IVS11-1، شایع‌ترین موتاسیون‌های این استان می‌باشد (۲۱).

مقایسه جهش‌های این منطقه با کشورهای هم‌جوار مشابهت الگویی در جهش‌ها را نشان می‌دهد به‌طوری‌که جهش IVS 1-5(G-C) در سرتاسر هند بالاترین فراوانی را به خود اختصاص داده است. هم‌چنین در پاکستان نیز این موتاسیون به همراه Fr8-9، del-25 به عنوان شایع‌ترین موتاسیون‌های آن کشور گزارش شده

تعداد فرزند	فراوانی (درصد)
۰	۷۳ (۳۲/۶)
<۳	۱۳۰ (۵۹/۱)
۴-۶	۲۰ (۸/۹)
>۶	۱(۰/۴)
جمع	۲۲۴ (۱۰۰)

توزیع فراوانی این جهش‌ها در جدول شماره ۲ نشان داده شده است در میان زوجین مراجعه کننده برای دو نفر الفاتالاسمی و برای دو نفر Hb S trial و برای یک نفر HbC و یک نفر HbD و هفت نفر که ناحی ژن بتای آن‌ها برای سکنس به خارج از کشور ارسال شده بود عدم موتاسیون در این ناحیه تشخیص داده شد. در بررسی مولکولی به عمل آمده بر روی ۱۲۵ پرزجفتی برای ۲۵ نمونه جنین ماژور، ۳۵ نمونه جنین سالم و ۶۵ نمونه جنین مینور تشخیص داده شد.

جدول شماره ۲: توزیع فراوانی جهش‌های ژن بتا گلوبین در زوجین معرفی شده به مرکز PND زاهدان

نوع موتاسیون	تعداد (درصد)
IVS 1-5(G-C)	۳۳۳ (۷۶/۵)
Fr- 8,9(+G)	۱۶ (۳/۷)
Codon 39(C-T)	۶ (۱/۴)
IVS 11-1(G-A)	۶ (۱/۴)
Codon 44(-C)	۳ (۰/۷)
-88(C-T)	۳ (۰/۷)
Del-25(3end)	۳ (۰/۷)
IVS 1-1(G-A)	۳ (۰/۷)
Codon 5(-CT)	۲ (۰/۵)

است (۲۴-۲۲). جهش IVS 1-5 شایع ترین جهش در ناحیه جنوب تایلند (۲۶،۲۵)، در بین مسلمانان تایلند (۲۷) و مالزی (۲۸) می باشد.

از جمله دلایل این هموژیستی بالا در جهش IVS

1-5 در این منطقه، می توان به کثرت ازدواج های فامیلی اشاره کرد به طوری که در این مطالعه نیز بیش از ۸۷ درصد زوجین وابستگی نسبی با یکدیگر داشتند. فراوانی موتاسیون IVS1-5 و داشتن جهشی مشابه با مادر در جنین های هتروزیگوت تحقق را بر آن داشت تا برای اطمینان از آلوده نبودن پرزها با نمونه های مادری در زمان گرفتن CVS علاوه بر تشخیص مستقیم (تعیین موتاسیون) نواحی پلی مورفیسم را با استفاده از تکنیک RFLP مورد ارزیابی قرار دهد.

پس از IVS 1-5 پنج جهش شایع بعدی، Fr8-9، CD39، IVS11-1، CD44 و 88 بودند که جمعاً ۹، ۷ درصد از جهش ها را به خود اختصاص داده بودند. پنج موتاسیون دیگر نیز جمعاً ۳-۲ درصد را به خود اختصاص داده بود و مطالعات انجام شده در سایر مناطق توزیع فراوانی ۶-۵ موتاسیون در حد ۷۰ درصد را گزارش کرده است. در این منطقه، به دلیل کثرت ازدواج های فامیلی، تنها یک موتاسیون معادل پنج موتاسیون در سایر مناطق، فراوانی دارد.

۶/۹ درصد خانواده های تالاسمی مراجعه کننده به این مرکز، دو و یا بیش تر از دو فرزند تالاسمی داشتند و برای تشخیص پیش از تولد تالاسمی جنین بعدی، مراجعه کرده بودند. این نتایج حاکی از علاقه شدید به داشتن فرزند در این منطقه می باشد بنابراین توصیه های بهداشتی برای پیش گیری از داشتن فرزند حتی در خانواده های دارای فرزند تالاسمی، زایل موثر نبوده است و یکی از دلایل افزایش موارد تالاسمی در سال های اخیر بوده است. با توجه به این که جهت بهزیستی یک بیمار تالاسمی در یک سال حدود

۵۰۰۰۰۰۰۰ ریال هزینه می شود در حالی که هزینه انجام یک تشخیص قبل از تولد تالاسمی حدود یک دهم آن می باشد و از طرفی با توجه به اعتقادات و مسائل خاص فرهنگی که تغییر در آن ها مستلزم آموزش و کار فرهنگی چندین ساله می باشد، تشخیص قبل از تولد تالاسمی به عنوان راهکاری مناسب در پیش گیری از موارد جدید تالاسمی مطرح می باشد.

تشخیص قبل از تولد تالاسمی در کاهش موارد جدید تالاسمی در کشورهای با شیوع بالای تالاسمی از جمله یونان، قبرس و ایتالیا نقش به سزایی داشته است (۲۹). در ایران نیز تشخیص قبل از تولد تالاسمی در چند مرکز محدود چند سالی است که انجام می شود عملکرد این مراکز در پیش گیری از موارد جدید تالاسمی در ایران نقش مهمی داشته است. اکثر جمعیت (حدود ۶۰ درصد) استان سیستان و بلوچستان در جنوب شرق کشور را اهل سنت تشکیل می دهد. از جمله مشکلات تشخیص قبل از تولد در کشورهای که اهل سنت هستند مانند پاکستان و مالزی مسئله سقط جنین است و این مسئله یکی از دغدغه های این مرکز در بد تأسیس بود در بد تشکیل این مرکز جلسات متعددی با علمای اهل سنت تشکیل شد تا اهمیت این روی کرد در پیش گیری از موارد جدید تالاسمی برای آن ها روشن شود. نتایج حاصل از این مطالعه نیز موید آن است که میزان استقبال اهل سنت برای گرفتن خدمات تشخیص قبل از تولد تالاسمی معادل اهل تشیع بوده است که این امر نشان دهنده آگاهی و علاقه آن ها برای پیش گیری از تالاسمی با استفاده از امکانات این مرکز می باشد لذا در صورتی که اطلاعات کافی و مناسب از طریق رسانه های عمومی و برنامه های محلی به مردم داده شود و هم چنین عاقدین محلی در این خصوص توجیه شوند می توان امیدوار بود که روزی شاهد موارد جدید تالاسمی در این استان و استان های هم جوار نباشیم.

که در مراحل مختلف انجام تشخیص پیش از تولد تالاسمی ما را یاری نموده‌اند، تشکر و قدردانی نمایم.

سپاسگزاری

لازم می‌دانم از آقای مصطفی شاهسونی، خانم‌ها صدیقه عارفی، ژیلاروستایی و آقای احمد عیسی زهی

فهرست منابع

1. Olivieri NF. The B Thalassemia. N. J. Med. 1999; 341(2): 99- 108.
2. Najmabadi H, Teimourian SH. Amplification Refractory Mutation System(ARMS) and Reverse Hybridization in the detection of thalassemia in mutation. Archives of Iranian Medicine 2001; 4(4): 165- 170.
3. Miri- Moghaddam E, Eshghi P., Naroenejade M. Thalassemia in Sistan * Baluchestan province, 1st congress on prevention of Non- communicable disease 29th Oct 2002 Tehran(Iran).
4. Fucharoen S, Winichagon P. Thalassemia and abnormal hemoglobin. Int. J. Hematol. 2002 Aug; 76 suppl 2: 83- 9.
5. kan Y. W., Golbus M.S., Klein P. successful application of prenatal diagnosis of a pregnancy at risk for homozygote B- Thalassemia. N. Engl. J. Med 1975; 292: 1096-99.
6. Orkin S.H., Markham A.F. Direct etection of the common Mediteranean B- thalassemia gene with synthetic DNA probes an alternative approach for prenatal diagnosis. J. Clin. Invest. 1983; 71: 775- 79.
7. Saiki R.K., Baugawan T.L., Horn G.T., mullis K.B. Analysis of enzymatically amplified B- globin gene and HLA- DQ alpha DNA with allele- specific oligonucleotide probes. Nature 1986; 324: 163- 66.
8. Saiki R.K., Walsh P.S., Levenson C.H. Genetic analysis of amplified DVA with Immobilized sewuence- specific oligonucleotied probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989; 86: 6230- 34.
9. CAI S.P., wall J., Kan Y.W. Reverse dot blot probes the screening of b- thalassemia mutations in Asians and American blacks. Hum. Mutat. 1994; 3: 59- 63.
10. Old JM, Varawalla NY, Weatherall DJ. Rapid detection and prenatal diagnosis of beta thalassemia: studies in Indian and Cypriot population in UK, Lancet 1990; 336: 834-7.
11. By Haig H., Kazazian Jr., Corinne DB. Molecular basis and prenatal diagnosis of B thalassemia. Blood 1988; 72(4): 1107- 16.
12. Maniatis T, Fritsch ET, Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982.

13. Mcpherson MJ, Quirke P, Tylor Gr. PCR, A practical Approach. IRL press, Oxford university press, 1992.
14. Newton Cr, Graham A, Hepteinstall LE, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). Nucleic Acid Res. 1989; 17: 2503- 16.
15. Old JM, Varawalla NY, weatherall. Rapid detection and prenatal diagnosis of betathalassemia: Studies in Indian and Cypriot population in UK, Lanvet 1990; 336: 834- 7.
16. Cao A, Saba L, Galanello R. Molecular diagnosis and carrier screening for B- thalassemia. JAMA 1997 Oct 15; 278(15): 1273-7.
17. Naijmabadi H, Karimi- Nejad R, Sahebjam S. the betathalassemi mutation spectrum in the Iranian population. Hemoglobin 2001 Aug; 25(3): 285- 96.
۱۸. مجتهدزاده فریدون: تعیین موتاسیون‌های بتاتالاسمی در شمال ایران (مازندران) اولین همایش ژنتیک و معلولیت‌ها. تهران. دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی. ۱۳۷۵.
19. Merat A, Haghshenas M. Beta- thalassemia in southwestern Iran. Hemoholibin 1993 Oct; 17(5): 427- 37.
۲۰. خدایی حسین، زینلی سیروس، دلمقانی صدیقه. بررسی مولکولی موتاسیون‌های ژن بتاگلوبین در بیماران مبتلا به بتاتالاسمی در استان بوشهر. مجله طب جنوب سال سوم شماره دوم سال ۱۳۷۹، ص: ۸۳- ۸۹.
21. Yavarian M, hartevelde CT, Batelaan D, Bernini LF. Molecular spectrum of beta thalassemia in the Iranian province of Hormozgan. Hemogolobin. 2001 Frb; 25(1): 35- 94.
22. Vaz FE, Thakur CB, Banerjee MK. Distribution of B- thalassemia Mutations in the Indian population referred to a diagnostic center. Hemoglobin 2000 Aug; 24(3): 181- 94.
23. Verma IC, Saxena R, Thomas E. Regional distribution of B- thalassemia mutations in Indian. Hum Genet. 1997 Jul; 100(1): 109- 13.
24. Ahmed S, petrou M, Saleem M. Molecular genetics of B- talassemia in Pakistan: a basis for prenatal diagnosis. Br. J. haematol 1997 may; 97(2): 504.
25. Laosomat V, Fucharoen SP, Panich V, et al. Molecular basis of beta thalassemia in south of Thailand. Am. J. Hematol 1992; 41: 194- 8.
26. Laosombat V, Nopparatana C, Wongchanchailert M, et al. Molecular basis of beta thalassemia in Thailand. Singapore paediatr J. 1995; 37: 148- 52.
27. Laosombat V, Nopparatana C, Wongchanchailert M, et al. molecular basis of beta thalassemia in thai Muslim patients in the south of Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Public health 1997; 28: 104- 5.
28. Yang KG, Kutlar F, George E, et al. Molecular characterization of beta globin gene mutations in Malay patients with

- Hb E- beta thalassemia and thalassemia major. Br.J. Heamatol 1989; 72: 73- 80.
29. Cao A, Galnello R, Rosatelli MC. Prenatal diagnosis and sreeningig of the heamoglobinopathies. Baillieres Clin. Haematol 1998; 11: 215- 238.