خون
دوره ۶ شماره ۲ تابستان ۸۸ (۱۱۵-۱۰۷)
مقاله پژوهشی

تعیین ژنوتیپ گروه‌های خونی با روش مولکولی در بیماران مبتلا به تالاسمی مراجعه کننده به درمانگاه بزرگسالان تهران

دکتر مژگان شایگان[۱]، شهرام سمیعی[۲]، دکتر آزیتا آذرکیوان[۳]،دکتر جف دانیلز[۴]، پیتر مارتین[۵]، زهرا عطایی[۶]، پروین لطفی[۷]، مهناز کواری[۸]، حسین لطفی[۶]، دکتر لیلا کسراییان[۹]

چکیده

سابقه و هدف

پس از مصرف خون، تعیین سرولوژیک گروه خونی گیرنده به علت جمعیت مختلط گلبول‌های قرمز مشکل می‌باشد. با توجه به اهمیت تعیین فنوتیپ صحیح گلبول‌های قرمز در بیماران وابسته به تزریق خون(نظیر بیماران تالاسمیک و کم خونی داسی شکل)، هدف این مطالعه راه‌اندازی روش مولکولی و سپس ارزیابی مقایسه‌ای با روش مولکولی هماگلوتیناسیون در تعیین گروه‌های خونی در بیماران تالاسمی دریافت کننده واحدهای متعدد بود.

مواد وروش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تشخیصی بود. DNA از خون محیطی ۲۰ فرد ظاهراً سالم فاقد سوابق خانوادگی تالاسمی و ۴۴ بیمار شامل ۳۵ بیمار مبتلا به تالاسمی ماژور(۱۹ نفر با عارضه همولیتیک انتقال خون و ۱۶ نفر فاقد این عارضه)، ۸ نفر مبتلا به تالاسمی اینترمدیا(۲ نفر با عارضه همولیتیک و ۶ نفر فاقد عارضه همولیتیک) و ۱ نفر مبتلا به تالاسمی سیکل سل با عارضه همولیتیک، جداسازی شد. آلل‌های RHD / RHC / RHc / RHE / RHe / JKA / JKB / FYA / FYB / KELL1 / KELL2 با آغازگرهای دست‌ساز به صورت موازی مورد بررسی قرار گرفتند. هم چنین بررسی فنوتیپی با روش هماگلوتیناسیون نیز بر روی نمونه خون محیطی انجام و با روش مولکولی مقایسه شدند.

یافته‌ها

تعیین فنوتیپ و ژنوتیپ در همه افراد کنترل مشابه بود. اما در مجموع ۵۳ مورد ناسازگاری بین دو روش مولکولی و آگلوتیناسیون در ۲۶ بیمار مشاهده شد که بیشترین ناسازگاری(۱۹ مورد) در گروه خونی Rh و پس از آن در گروه‌های خونی دافی(۱۵ مورد) و کید(۱۵ مورد) بود.

نتیجه گیری

در این تحقیق روش سرولوژی قادر به تعیین صحیح آنتی‌ژن‌های گروه خونی در بیماران تحت بررسی نبود ولی تعیین ژنوتیپ در تعیین گروه خون واقعی بیماران دریافت کننده واحدهای خون موفق بوده و می‌تواند به انتخاب گلبول‌های قرمز فاقد آنتی‌ژن‌هایی که هدف آلوایمونیزاسیون واقع شده‌اند، در تزریق‌های بعدی کمک نماید. حساسیت/اختصاصیت و ارزش‌های اخباری مثبت و منفی روش آگلوتیناسیون در مقایسه با روش مولکولی برای آنتی‌ژن D ، نتایج نسبتاً خوبی حاصل نمود، شاید بدان علت که این آنتی‌ژن قبل از شروع تزریق خون به بیماران تعیین می‌شود و در صورت تزریق خون نیز این سازگاری رعایت می‌شود. لذا به نظر می‌رسد اتخاذ چنین تصمیمی در مورد تعیین گروه‌های فرعی در بدو شروع به تزریق خون حداقل برای زیر گروه‌های Rh و Kell ، که بیشترین سهم را در ایجاد عوارض همولیتیک دارند، با توجه به هزینه بالاتر روش مولکولی، بسیار مقرون به صرفه باشد. هم چنین تعیین این آنتی‌ژن‌ها در تعداد محدودی از اهداکنندگان مستمر نیز می‌تواند به تعیین اهداکننده با گروه خونی مناسب برای این بیماران کمک کننده باشد.

کلمات کلیدی: تالاسمی، PCR ، آنتی‌ژن‌های گروه خونی

تاریخ دریافت : ۸۷/۷/۲۴
تاریخ پذیرش : ۸۸/ ۵/۱۹

۱ـ مؤلف مسؤول: PhD ایمونولوژی ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵
۲ـ کارشناس ارشد بیوشیمی ـ مربی مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۳- فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی کودکان ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران ـ درمانگاه تالاسمی
۴- PhD ـ رییس بخش مولکولی آزمایشگاه مرجع جهانی گروه‌های خونی ـ انتقال خون انگلیس ـ بریستول
۵ـ کارشناس ارشد ـ بخش مولکولی آزمایشگاه مرجع جهانی گروه‌های خونی ـ انتقال خون انگلیس ـ بریستول
۶ـ کارشناس بیولوژی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۷ـ کارشناس امور انتقال خون ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۸ـ کارشناس میکروب‌شناسی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۹ـ متخصص پزشکی اجتماعی ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و پایگاه منطقه‌ای آموزشی انتقال خون شیراز

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

آنتی‌ژن‌های گروه‌های خونی در انتقال خون و پیوند اعضا، آنمی همولیتیک خود ایمن و ناسازگاری مادر و جنین نقش مهمی دارند(۱). به دنبال انتقال خون، تعیین سرولوژیک گروه خونی گیرنده، به علت جمعیت مختلط گلبول‌های قرمز مشکل می‌باشد(۳، ۲). لذا تعیین فنوتیپ صحیح گلبول‌های قرمز در بیماران وابسته به تزریق خون نظیر بیماران تالاسمیک، کم خونی داسی شکل و آنمی همولیتیک اتوایمیون، به علت حضور گلبول‌های تزریقی در گردش خون گیرنده، با سختی مواجه است(۳). هم چنین روش هماگلوتیناسیون جهت تعیین فنوتیپ گلبول قرمز در بیمارانی که اخیراً انتقال خون داشته و ایمیونیزه نیز شده‌اند، به علت پوشیده شدن با IgG وقت‌گیر بوده و تفسیر نتایج مشکل می‌باشد(۴). در حال حاضر چنانچه با بیماری برخورد شود که به علت حضور آنتی‌بادی‌ها، گلبول‌های قرمز پوشیده شده باشند، احتمالاً نتایج روش آگلوتیناسیون مثبت می‌گردند. لذا تعیین گروه خونی این افراد مشکل بوده و در صورت نیاز وی به تزریق خون، دستور تزریق گروه خونی O منفی داده می‌شود. در صورتی که ممکن است ناسازگاری گروه‌های فرعی وجود داشته و باعث آلوایمیونیزاسیون شود. شیوع این آنتی‌بادی‌ها در مطالعه‌های مختلف به صور متفاوت،(۳ تا ۲۴ درصد) گزارش شده‌اند(۹-۵). فایده بررسی ژنوتیپ(DNA) آنتی‌ژن‌های گلبول قرمز به عنوان وسیله‌ای برای درمان بیمارانی که تزریق خون متعدد دارند، جهت غلبه بر محدودیت‌های روش هماگلوتیناسیون می‌باشد. زیرا این روش با انتقال خون تحت تاثیر قرار نمی‌گیرد(۴).

از نظر تطابق روش‌های آگلوتیناسیون و روش PCR ، جهت بررسی ژنوتیپ(DNA) آنتی‌ژن‌ها، گزارش‌های مختلفی وجود دارند. رزمن و همکاران(در سال ۲۰۰۰ میلادی) گزارش کردند علی‌رغم دریافت خون طی نمونه‌گیری، نتایج حاصل از تعیین فنوتیپ با نتایج تعیین ژنوتیپ به روش مولکولی مشابه می‌باشند(۲). کستیلیهو در مطالعه خود بر روی ۴۰ بیمار مبتلا به کم خونی داسی‌شکل در کل به ۶ مورد ناسازگاری، شامل ۴ مورد ناسازگاری در سیستم کید که ۲ مورد ناسازگاری در سیستم دافی داشته‌اند، اشاره کرد(۱۰). در مطالعه دیگری توسط همین فرد بر روی ۱۰ بیمار مبتلا به تالاسمی با عارضه واکنش همولیتیک تاخیری، در کل به ۹ مورد ناسازگاری بین دو روش فوق اشاره نمود که شامل ۳ مورد از نظر RHC ، ۲ مورد از نظر RHE ، ۳ مورد از نظرکید(Jka Jkb) و یک مورد از نظر سیستم دافی می‌باشند(۱۱). ایرشاید در بررسی ۲۰۰ اهداکننده خون در اردن(۲۰۰۲)، در ۶ مورد عدم تطابق بین فنوتیپ و ژنوتیپ را در سیستم دافی مطرح و نتیجه‌گیری نمود که کلاً در اهداکنندگان این دو روش از تطابق مناسبی برخوردارند(۱). پلگرینی و همکاران نیز در بررسی ۲۵۰ فرد اهداکننده خون، یکسان بودن نتایج تعیین فنوتیپ و ژنوتیپ افراد سالم را اعلام نمودند(۳). با توجه به اطلاعات موجود و عدم بررسی روش‌های آگلوتیناسیون و مولکولی در بیماران تالاسمی در ایران، هدف این مطالعه ضمن راه‌اندازی روش مولکولی، تعیین ژنوتیپ گروه‌های خونی(Rh ، Duffy ، Kidd ، Kell) به روش مولکولی و مقایسه آن با روش آگلوتیناسیون، در برخی بیماران مراجعه‌کننده به درمانگاه بیماران بزرگسال تهران بود.

تعیین ژنوتیپ در تعیین یا تشخیص صحیح گروه‌های خونی واقعی در بیمارانی که مکرراً خون دریافت می‌کنند مهم است و به تعیین آلوآنتی‌بادی‌های مشکوک و انتخاب گلبول‌های قرمز فاقد آنتی‌ژن‌های خاص برای تزریق کمک می‌کند. به عبارتی؛ با تعیین ژنوتیپ صحیح گروه‌های فرعی خون به روش مولکولی در بیمارانی که تزریق خون مکرر داشته و تعیین فنوتیپ گلبول‌های آن‌ها با روش آگلوتیناسیون مشکل می‌باشد، می‌توان امکان تزریق خون سازگار جهت کاهش عوارض انتقال خون را با اطمینان بیشتری فراهم نمود. روش‌های مولکولی برای تعیین آنتی‌ژن‌های گروه‌های خونی در مشخص نمودن اختلالات و ناسازگاری‌های مادر و جنین، تعیین ابوت(Paternity) و جایگزینی رده اریتروئیدی پس از پیوند سلول‌های بنیادی خونساز نیز قابل استفاده می‌باشد(۱۲).

مواد و روش ها

این مطالعه از نوع تشخیصی و جهت ارزیابی قدرت تشخیصی روش آگلوتیناسیون در مقایسه با روش مولکولی

www.SID.ir
Archive of SID

در تعیین آنتی‌ژن‌های گروه‌های خونی در بیماران مبتلا به تالاسمی مراجعه کننده به درمانگاه بزرگسال تهران و تعدادی از افراد سالم فاقد این بیماری و یا اهداکنندگان خون انجام شد. روش نمونه‌گیری، تصادفی آسان بود.

۵ سی‌سی نمونه خون محیطی در لوله حاوی EDTA گرفته شد. ۴۴ بیمار مبتلا به تالاسمی مراجعه کننده به درمانگاه بزرگسالان توسط پزشک معالج وارد این مطالعه شدند. گرچه در این نوع مطالعه نیازی به گروه کنترل نمی‌باشد اما جهت مقایسه نتایج آگلوتیناسیون با روش مولکولی، ۲۰ فرد فاقد بیماری فوق یا اهداکنندگان خون نیز مورد نمونه‌گیری قرار گرفتند.

پس از ارجاع بیماران و نمونه‌گیری، تعیین فنوتیپ گلبول قرمز مطابق با دستورالعمل‌های موجود با روش آگلوتیناسیون برای گروه‌های خونی Duffy ، Kidd ، Kell ، RhD / C/ c/ E/ e انجام شد. روش سرولوژی(با استفاده از آنتی‌سرم‌های Innotrain) انجام شد. مطابق دستورالعمل کارخانه سازنده، آنتی‌سرم را به هر لوله آزمایش افزوده و خوب مخلوط نمودیم. با تکان دادن لوله، گلبول‌ها را از ته لوله جدا کرده و از لحاظ آگلوتیناسیون یا همولیز درجه‌بندی شدند. آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز در حضور یک آنتی‌سرم خاص، نشانه واکنش مثبت بوده و حضور آنتی‌ژن در سطح گلبول قرمز را نشان می‌دهد. عدم آگلوتیناسیون به عنوان نتیجه منفی تلقی می‌گردد و دال بر فقدان آنتی‌ژن در سطح گلبول قرمز می‌باشد. برای روش مولکولی، استخراج DNA با کیت استخراج High Pure (رُوش) Nucleic Acid Kit انجام و تا زمان آزمایش برای(RHD, RHE/Rhe, RHC/RHc, KELL1/KELL2, FYA/FYB, JKA/JKB) و بررسی موتاسیون ناحیه پروموتر ژن دافی، در دمای C ° ۲۰- نگهداری شد.

برای بررسی آلل هر آنتی‌ژن ابتدا طی فرآیند PCR ، DNA استخراج شده از نمونه‌ها تقویت و تکثیر شده و سپس محصول این مرحله از PCR با به کارگیری آنزیم‌های اندونوکلئاز در جایگاه‌های اختصاصی برش داده شدند(RFLP= Restriction Fragment Length Polymorphism) و قطعات حاصله با استفاده از الکتروفورز مورد شناسایی قرار گرفتند. روش‌ها برای تعیین ژنوتیپ گلبول قرمز همراه با تغییراتی در این مرکز استفاده شدند. برای بررسی هر آنتی‌ژن، یک میکروتیوب جداگانه شامل µl ۸/۴ از DNA استخراج شده، µl ۱۱/۶ مخلوط آغازگر مربوط به هر آنتی‌ژن(با غلظت نهایی µm ۰/۵)، µm ۲۰۰ از نوکلئوتیدها،($MgCl_2$ ۲ mmol) و Betaein با غلظت ۱۰٪ ، بافر X ۱۰ و به آن µl ۰/۳ Hot Start Taq Enzyme (محصول رُوش) افزوده و با پیپت کردن یا ورتکس(۱۰-۵ ثانیه) خوب مخلوط شدند.

آغازگرهای هر آلل دست‌ساز و در این مرکز تحقیقات تهیه شده بودند(جدول ۱). میکروتیوب‌ها را در ترمال سیکلر(Heating block محصول کوربت) چیده و برنامه زیر به آن داده شد:

جدول ۱: توالی آغازگرهای تهیه شده در آزمایشگاه(۴)

آغازگرها	سکانس
CE14	5'-GGC AAC AGA GCA AGA GTC CA-3'
CEX5	5'- CTG ATC TTC CTT TGG GGG TG-3'
KEL S	5'- AAG CTT GGA GGC TGG CGC AT-3'
KEL R	5'- CCT CAC CTG GAT GAC TGG TG- 3'
FYAB1	5'- TCC CCC TCA ACT GAG AAC TC-3'
FYAB2	5'- AAG GCT GAG CCA TAC CAG AC-3'
FYN1	5'-CAA GGC CAG TGA CCC CCA TA-3'
FYN2	5'-CAT GGC ACC GTT TGG TTC AG-3'
JKIS	5'-TGA GAT CTT GGC TTC CTA GG-3'
JK2	5'-ATT GCA ATG CAG GCC AGA GA-3'
RH141	5'-GTG TCT GAA GCC CTT CCA TC-3'
RH142	5'-GAA ATC TGC ATA CCC CAG GC-3'

۱ چرخه در C ° ۹۵ به مدت ۱۵ دقیقه و ۴۰ چرخه(در C °۹۵ به مدت ۲۰ ثانیه، در C ° ۶۲ به مدت ۴۰ ثانیه، در C ° ۷۲ به مدت ۳۰ ثانیه) و ۱ چرخه در C ° ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه.

پس از پایان آمپلی فیکاسیون، محصولات PCR برای RFLP طبق برنامه زیر مورد استفاده قرار گرفتند.

کلیه آنزیم‌ها محصولات رُوش بودند که اختصاصیت آن‌ها برای ژن‌ها در جدول ۲ قید شده‌اند، برای هر آنتی‌ژن یک میکروتیوب مورد بررسی قرار گرفت.

محتویات هر میکروتیوب را با پیپت کردن خوب مخلوط و با پارافیلم مسدود نمودیم. آن‌ها را در سوراخ‌های یک صفحه اسفنجی قرار داده و در روی

Archive of SID
www.SID.ir

بن‌ماری ۳۷ °C به مدت یک شب شناور شدند. سپس برای غیر فعال‌سازی آنزیم‌ها، میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵ °C و بلافاصله روی یخ چیده شدند.

برای بررسی نتایج RFLP ، با افزودن ۰/۵ µl رنگ Loading به محصولات روی ژل آگارز ۴٪(high-resolution) تهیه شده در بافر TBE ۱ X و حاوی ۱ µl محلول اتیدیوم بروماید، در مدت ۶۰-۴۰ دقیقه با ولتاژ حدود ۵ V/cm و در حضور یک size marker ، الکتروفورز گردیدند. تفسیر نتایج با بررسی قطعات ایجاد شده بر حسب اوزان مولکولی مربوطه در مقایسه با سایز مارکر انجام شد(جدول ۳)(۴). برای بررسی آلل‌های آنتی‌ژن‌های RHC و RHD ، روش جداگانه‌ای استفاده شد که شامل ۸ µl از DNA در ۲ میکروتیوب جداگانه به همراه ۱۲ µl از مخلوط آغازگر مربوط به هر آنتی‌ژن با غلظت ۰/۵ µm و ($Mg Cl_2$ (۲ m mol ، نوکلئوتیدها(۲۰۰ µm) بافر ۱۰ X ، Fast start Taq Enzyme ۰/۳ µl محصول رُوش و Betaein با غلظت ۱۰٪ اضافه شدند.

پس از مخلوط کردن محتویات هر لوله، به هر میکروتیوب ۲۰ µl روغن معدنی افزوده و در ترمال سایکلر با برنامه زیر آزمایش شدند:

برنامه ۱ : ⟵ ۷ min ۹۵ °C ⟵ (۱ cycle)

برنامه ۲ : ⟵ ۲۰ Sec ۹۴ °C

: ⟵ ۳۰ Sec ۶۲ °C ⟵ (۳۵ cycle)

⟵ ۳۰ Sec ۷۲ °C

برنامه ۳ : ⟵ ۱۰ Sec ۷۲ °C ⟵ (۱ cycle)

برای بررسی نتایج Rh D/C/c ، با افزودن ۰/۵ µl رنگ Loading به محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪(Range – Wide) تهیه شده در بافر TBE ۱ X و حاوی ۱ µl/ml محلول اتیدیوم بروماید به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه با ولتاژ حدود ۵ V/cm در حضور یک size marker ،الکتروفورز گردیدند.

جهت کنترل درستی نتایج، کلیه نمونه‌های بیماران و کنترل در مرکز انتقال خون بریستول به روش Real time PCR مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌ها در مرکز ما به صورت کورسو بررسی و نتایج دو مرکز در پایان با یکدیگر مقایسه شدند.

یافته ها

بیماران تحت مطالعه ۴۴ بیمار مبتلا به تالاسمی شامل ۳۵ نفر مبتلا به تالاسمی ماژور(۱۹ نفر آن‌ها دارای عارضه هموليتيک و ۱۶ نفر فاقد این عارضه)، ۸ نفر مبتلا به تالاسمی اینترمدیا(۲ نفر با عارضه و ۶ نفر فاقد عارضه) و ۱ نفر مبتلا به تالاسمی سیکل سل(با عارضه هموليتيک) بودند. محدوده سنی بیماران ۵۱-۱۳ سال و افراد کنترل ۵۲-۱۹ سال بود که از نظر آماری فاقد اختلاف معنادار بودند. نمونه گیری در این مطالعه با فاصله زمانی ۳۰-۷ روز(با میانگین ۱۴ روز) از دریافت قبلی خون انجام شد. فواصل تزریق خون در بیماران تالاسمی ماژور ۴-۳ هفته و تالاسمی اینترمدیا در صورت لزوم، به بیش از چند ماه نیز می‌رسید و تعداد واحدهای خون دریافتی توسط بیماران در محدوده ۱۲۸ تا ۴۲۶ واحد خون کامل(از زمان تشخیص بیماری در آن‌ها تا زمان مطالعه) بود.

طبق مقررات موجود در درمانگاه بزرگسالان، برای تزریق خون به بیماران از فیلترهای کاهنده لکوسیتی در بستر(بعثت) استفاده شد.

یافته‌های این مطالعه نشان دادند که نتایج روش مولکولی در هر دو گروه در ایران(انجام شده به روش RFLP) مشابه نتایج روش مولکولی انجام شده به روش Real Time PCR در بریستول بودند و راه‌اندازی روش مولکولی که یکی از اهداف این مطالعه بود، حاصل گردید.

در افراد سالم، نتایج دو روش مولکولی و سرولوژی یکسان بودند. در این افراد فراوانی آنتی‌ژن D ۷۵٪، آنتی‌ژن C ۶۰٪، آنتی‌ژن c ۸۰٪، آنتی‌ژن E ۱۵٪، آنتی‌ژن e ۱۰۰٪، آنتی‌ژن Fya ۷۰٪، آنتی‌ژن Fyb۸۰٪، آنتی‌ژن Jka ۱۰٪، آنتی‌ژن Jkb ۴۰٪، آنتی‌ژن K ۲٪ و آنتی‌ژن k ۱۰۰٪ بود(جدول ۴). اما در مورد هم‌خوانی روش سرولوژی با روش مولکولی در بیماران تفاوت‌هایی مشاهده گردید(جدول ۵).

یک مورد عدم تطابق در فرد بیماری که فنوتیپ وی RhD منفی بود، با روش مولکولی که RHD مثبت بود مشاهده شد که احتمالاً به علت حضور گلبول RhD منفی‌دهنده در گردش خون وی بوده است. مجموعاً در ۲۶ نفر از بیماران، ۵۳ مورد ناسازگاری مشاهده گردید.

www.SID.ir
Archive of SID

جدول ۲: حجم و مواد مورد نیاز در هر لوله برای RFLP

آلل مورد بررسی	حجم آنزیم	میزان آب	میزان BSA	میزان PCR Product	میزان آنزیم
RH (E/e)	MN۱۱–(۲/۵µl)	۱/۵ µl	–	۲۰ µl	۱ µl
JKA/JKB	MN۱۱–(۲/۵µl)	۱/۵ µl	–	۲۰ µl	۱ µl
FYA/FYB (Duffy I)	Ban–۱–(۲µl)	–	۰/۲ µl	۱۷/۵ µl	۰/۵ µl
برای بررسی موتاسیون Duffy (Duffy II)	Sty –۱–(۲/۵µl)	۱/۵ µl	–	۲۰ µl	۱ µl
KEL1/KEL2	BSM –۱–(۲/۵µl)	۱/۵ µl	–	۲۰ µl	۱ µl

جدول ۳: اندازه قطعات و تفسیر نتایج روش RFLP

سیستم گروه خونی	آغازگرها	سایز	آنزیم	سایز	Interpretation
RHE/e	CE14 CEX5	۴۷۴	MNl 1	۴۸، ۷۳، ۸۳، ۱۱۱ ۱۴، ۲۰، ۳۷، † ۴۴	RHE/RHE
				۷۳، ۸۳، ۱۱۱، ۱۴۸ ۱۴، ۲۰، ۳۷، † ۴۴، ۴۸	RHE/RHe
				۴۸، ۷۳، ۸۳، ۱۴۸ ۱۴، ۲۰، † ۴۴	RHe/RHe
Kell	KEL S KEL R	۱۵۶	Bsm 1	۵۶، ۱۰۰ ۵۶، ۱۰۰، ۱۵۶ ۱۵۶	KEL 1/ KEL 1 KEL 1/ KEL 2 KEL 2/ KEL2
Duffy I	FY AB1 FY AB2	۳۹۲	Ban 1	۸۶، ۹۶، ۲۱۰ ۸۶، ۹۶، ۲۱۰، ۳۰۶ ۸۶، ۳۰۶	FYA/ FYA FYA/ FYB FYB/ FYB
Duffy II*	FYN1 FYN2	۱۸۹	Sty 1	۸۱، ۱۰۸ ۲۰، ۶۱، ۸۱، ۱۰۸ ۲۰، ۶۱، ۱۰۸	Wild/WildGATA Wild/Mutated Mutated/Mutated
Kidd	JKIS JK2	۲۱۰	MNl 1	۲۲، ۴۸، ۶۲، ۷۸ ۲۲، ۴۸، ۶۲، ۷۸، ۸۴ ۴۸، ۷۸، ۸۴	JKA/JKA JKA/JKB JKB/JKB

* For Mutation analysis in promoter region of Duffy genes

جدول ۴: فراوانی(مطلق و نسبی) آنتی‌ژنی به روش سرولوژی و مولکولی در بیماران

آنتی‌ژن‌ها	روش مولکولی		روش سرولوژی	
	مثبت تعداد(درصد)	منفی تعداد(درصد)	منفی تعداد(درصد)	مثبت تعداد(درصد)
D	(۸۲)۳۶	(۱۸)۸	(۸۴)۳۷	(۱۶)۷
C	(۶۶)۲۹	(۳۴)۱۵	(۷۹)۳۵	(۲۱)۹
c	(۶۸)۳۰	(۳۲)۱۴	(۸۹)۳۹	(۱۱)۵
E	(۲۵)۱۱	(۷۵)۳۳	(۵۰)۲۲	(۵۰)۲۲
e	(۱۰۰)۴۴	–	(۱۰۰)۴۴	–
Fya	(۷۵)۳۳	(۲۵)۱۱	(۸۹)۳۹	(۱۱)۵
Fyb	(۸۰)۳۸	(۲۰)۹	(۸۶)۳۸	(۱۴)۶
Jka	(۸۲)۳۸	(۱۸)۸	(۹۳)۴۱	(۷)۳
Jkb	(۶۶)۲۹	(۳۴)۱۵	(۸۲)۳۶	(۱۸)۸
K	(۱۱)۵	(۸۹)۳۹	(۹)۴	(۹۱)۴۰
k	(۱۰۰)۴۴	–	(۱۰۰)۴۴	–

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۵: نتایج تعیین فنوتیپ و ژنوتیپ و وارد ناسازگاری روش سرولوژی و مولکولی در بیماران

n	ژنوتیپ حقیقی(با PCR)	n	فنوتیپ(با سرولوژی)
(۱۹ Discrepancies)	RHE/RHE	۱	E^-e^+
	Rhe/Rhe	۸	E^+e^+
	RHc/RHc	۵	C^+c^+
	RHC/RHC	۴	c^+c^+
	RHC/RHc	۱	c^+c^+
(۳ Discrepancies)	KEL1/KEL2	۱	K^-k^+
	KEL2/KEL2	۲	K^+k^+
(۱۵ Discrepancies)	FYB/FYB	۵	$Fy(a^+b^+)$
	FYA/FYA	۶	$Fy(a^+b^+)$
	FYA/FYB	۴	$Fy(a^+b^-)$
(۱۵ Discrepancies)	JKA/JKA	۷	$JK(a^+b^+)$
	JKA/JK	۲	$JK(a^+b^-)$
	JKB/JKB	۵	$JK(a^+b^+)$
	JKA/JKA	۱	$JK(a^-b^+)$

بیشترین ناسازگاری در گروه خونی Rh و پس از آن در گروه‌های خونی دافی، کید و کل مشاهده شد. در کل ۴ مورد موتاسیون برای دافی شامل ۳ مورد در افراد گروه کنترل(۲ فرد مؤنث و یک فرد مذکر) و یک مورد در یک بیمار مذکر مبتلا به تالاسمی ماژور با عارضه همولیتیک شناخته شد.

بحث

مطالعه حاضر نشان داد همان‌گونه که انتظار می‌رود، در افراد با انتقال خون متعدد و مکرر(بیماران تالاسمی بتا یا ماژور) در تعیین گروه‌های خونی به روش آگلوتیناسیون در مقایسه با روش مولکولی، ناسازگاری‌هایی وجود دارد و در ۵۳ مورد ناسازگاری بین دو روش در ۲۶ بیمار مشاهده گردید. در طی این مطالعه، انجام آزمایش و تفسیر نتایج نیازمند ممارست است. زیرا روش‌های مبتنی بر PCR مستعد آلودگی بوده و هم چنین وجود یک ژنوتیپ خاص نیز ممکن است بیانگر حضور آنتی‌ژن مربوطه روی غشاء گلبول قرمز نباشد که چنین وضعیت‌هایی شامل ردیابی ژن‌ها با موتاسیون‌های خاموش و خارج از نقاط مورد بررسی(GATA Box) است . در یک مطالعه در ترکیه توسط کاناتان و همکاران که برای ۳۰۶۵ اهداکننده خون و ۱۵۵ بیمار مبتلا به تالاسمی، فنوتیپ آنتی‌ژن‌های Rh به روش ژل آگلوتیناسیون(دیامد) بررسی شدند، مشخص گردید که وفور فنوتیپ R1R2 : ۳۰/۵٪، Rlr : ۳۳٪، R2R2 : ۲/۴٪، R2r : ۱۰/۴٪، rr : ۱۱/۶، R1R1 : ۱۲/۸٪ و در بیماران به ترتیب: ۳۵/۷٪، ۷/۴٪، ۲/۸٪، ۶/۶٪، ۱۰/۳٪ و ۵/۷٪ گزارش گردیدند که از این نظر تفاوت‌هایی بین نسبت فراوانی فنوتیپ آنتی‌ژن‌های مختلف سیستم Rh با مطالعه حاضر مشاهده شدند، که این تفاوت‌ها قابل انتساب به تفاوت‌های نژادی و قومی ملل مختلف است(۱۵-۱۳). دکتر کاستیلهو در سال ۲۰۰۰، عدم تطابق بین دو روش مولکولی و سرولوژی را در ۵۰ بیمار مبتلا به تالاسمی بتا بررسی نمود و موارد زیر را گزارش کرد: تطابق صد در صد بین دو روش در مورد RHD و کل (KELL1/KELL2) ، ۳ مورد ناسازگاری در سیستم کید(فنوتیپ Jka/Jkb با ژنوتیپ JKB/JKB) و در ۴۴ مورد با GATA Box طبیعی بوده که در ۳ مورد ناسازگاری(فنوتیپ fya/fya با ژنوتیپ FYA/FYB) مشاهده شد(۱۵). بین فنوتیپ و ژنوتیپ ۱۰۰ اهداکننده خون نیز تطابق وجود داشت. هم چنین وی در

www.SID.ir
Archive of SID

مطالعه دیگری در سال ۲۰۰۲، بر روی ۱۰ بیمار مبتلا به تالاسمی بتا در ۹ مورد از ۱۰ بیمار، اختلاف بین فنوتیپ و ژنوتیپ گلبول‌های قرمز را گزارش نمود(۱۱). ۵ مورد عدم تطابق در سیستم RH(یک فنوتیپ Rhcc با ژنوتیپ واقعی RHC/C ، ۲ فنوتیپ RhCc با ژنوتیپ واقعی RHC/C ، ۲ فنوتیپ RhEe با ژنوتیپ واقعی RH e/e)، ۳ مورد عدم تطابق در سیستم کید با فنوتیپ(+a+b) JK (که ژنوتیپ واقعی JKB بوده)، ۱ مورد عدم تطابق در سیستم دافی(با فنوتیپ(-a+b) fy که با ژنوتیپ واقعی FYB بود. در صورت وقوع موتاسیون در بخش پروموتور ژن b سیستم دافی(FYB)، پروتئین در سطح رده اریتروئیدی ظاهر نمی‌شود. اما در روی سایر رده‌های غیر اریتروئیدی مشاهده می‌شود(۱۶، ۱۵). لذا در دو فرد کنترل بین وقوع موتاسیون در ژن دافی b و ظهور این آنتی‌ژن روی گلبول قرمز وجود ندارد و با فنوتیپ(-fya+/fyb) fya/fya مطابقت دارد. اما در مورد بیمار مبتلا به تالاسمی، قاعدتاً نباید روی گلبول قرمز وی آنتی‌ژن دافی b حضور داشته باشد که با فنوتیپ تعیین شده برای بیمار(+fya+/fyb) تطابق ندارد. احتمالاً علت، حضور این آنتی‌ژن در روی گلبول‌های دریافتی موجود در گردش خون وی می‌باشد. البته بیمارانی که دارای چنین فنوتیپی هستند، نیازمند دریافت خون از افراد دافی b^- (-fyb) نیستند. پلگرینو در مطالعه بر روی ۲۵۰ اهداکننده خون اعلام نمود که علی‌رغم وجود ژن FYB در ۳۰/۵٪ ، فنوتیپ آن‌ها به صورت Fya/Fya می‌باشد(۳).

امروزه تعیین ژنوتیپ به روش مولکولی در فرآورده‌های گلبول قرمز، منجر به دسترسی و تهیه فرآورده‌هایی با فنوتیپ سازگار و مشابه برای بیمارانی می‌شود که به علت فقدان یک آنتی‌ژن، ایجاد آنتی‌بادی نموده‌اند. روش مولکولی در تشخیص ناسازگاری‌های تعیین گروه‌های خونی، ناسازگاری مادر و جنین و پیشگویی بیماری همولیتیک کمک نموده و منجر به بهبود و پیشرفت تهیه موارد مورد نیاز بررسی گلبول‌های قرمز شده است. اما علی‌رغم پذیرش این روش به عنوان یک روش استاندارد، باید یادآوری کرد که تعیین ژنوتیپ با این روش، همواره فنوتیپ را پیشگویی نمی‌نماید(۱۷).

نتیجه‌گیری

مشکل ایمونیزاسیون منجر به توصیه‌هایی شده که بیماران مبتلا به تالاسمی بتا، فرآورده‌های خون را از اهداکنندگان با آنتی‌ژن‌های نزدیک‌تر به خود خون دریافت نمایند(۱۶). با توجه به تعیین حساسیت/اختصاصیت و ارزش‌های اخباری مثبت و منفی روش آگلوتیناسیون در مقایسه با روش مولکولی برای آنتی‌ژن D ، نتایج نسبتاً خوبی حاصل گردید. شاید بدان علت که این آنتی‌ژن قبل از شروع تزریق خون به بیماران تعیین می‌شود و در صورت تزریق خون نیز این سازگاری رعایت می‌شود. لذا به نظر می‌رسد اتخاذ چنین تصمیمی در مورد تعیین گروه‌های فرعی خون در بدو شروع به تزریق خون، با توجه به هزینه بالاتر روش مولکولی، حداقل برای زیر گروه‌های Rh و Kell که بیشترین سهم را در ایجاد عوارض همولیتیک دارد بسیار مقرون به صرفه است. هم چنین تعیین این آنتی‌ژن‌ها در تعداد محدودی از اهداکنندگان مستمر(ترجیحاً غیر خویشاوند) نیز می‌تواند به تعیین اهداکننده با گروه خونی مناسب برای این افراد کمک کننده باشد.

تشکر و قدردانی

هزینه‌های این مطالعه توسط مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران تامین شده است. نویسندگان مقاله از همکاران محترم درمانگاه تالاسمی بزرگسالان تهران و پرسنل بخش نمونه‌برداری آزمایشگاه تشخیص طبی سازمان انتقال خون ایران، آقای احسان قاضی و خانم اکرم شهرابی که در انجام این مطالعه همکاری نمودند تشکر می‌نمایند.

Archive of SID
www.SID.ir

References :

1- Irshaid NM. Phenotyping prediction by DNA – Based typing of clinically significant blood group system in jordanian blood donors. Vox sang 2002; 83 (1): 55- 62.

2- Rozman O, Dovc T, Gassner C. Differentiation of autologous ABO, RHD, RHCE, KEL, Jk and FY blood group genotypes by analysis of pripheral blood samples of patients who have recently received multiple transfusions. Transfusion 2000; 40 (8): 936-42.

3- Pellegrino JJr, Castilho L, Rois M, De Souza CA. Blood group: Genotyping in a population of highly divers ancestory. J Clin Lab Anal 2001; 15(1): 8-13.

4- Reid ME, Rios M, Powell VI, Charles-Pierre D, Malavade V. DNA from blood samples can be used to genotype patients who have recently received a transfusion. Transfusion 2000; 40(1): 48-53.

5- Fongsatitkul L, Bannawat U, Sanguansermsri T, Kulapongs P. Unexpected red cell antibodies in thalassemic children. Birth Defects Orig Artic Ser 1988; 23 (5B): 291-3 [Abstract].

6- Spanos T, Karageorga M, Ladis V, Peristeri J, Hatziliami A, Kattamis C. Red cell alloantibodies in patients with thalassemia. Vox Sang 1990; 58(1): 50-5.

7- Coles SM, Klein HG, Holland PV. Alloimmunization in two multitransfused patient populations. Transfusion 1981; 21(4): 462-6.

8- Sirchia G, Zanella A, Parravicini A, Morelati F, Rebulla P, Masera G. Red cell alloantibodies in thalassemia major. Results of an Italian cooperative study. Transfusion 1985; 25(2): 110-2.

9- Tardtong P, Ratanasirivanich P, Chiewsilp P, Hathirat P. Red cell antibodies in thalassemiahemoglobinopathy patients. Birth Defects Orig Artic Ser 1988; 23 (5B): 287-9 [Abstract].

10- Castilho L, Rios M, Bianco C, Pellegrino J Jr, Alberto FL, Saad ST, *et al.* DNA- Based typing of blood groups for the management of multiply-Transfused sickle cell disease patients. Transfusion 2002; 42(2): 232-8.

11- Castilho L, Rios M, Pellegrino JJr, Saad SF, Costa F. Blood group genotyping facilitates transfusion of beta-thalassemia patients. J Clin Lab Anal 2002; 16(5): 216-20 [Abstract].

12- Armistead PM, Mohseni M, Gerwin R, Walsh EC, Iravani M, Chahardouli B, *et al*. Erythroid-lineage-specific engraftment in patients with severe hemoglobinopathy following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Exp Hematol 2008; 36(9): 1205-15.

13- Canatan D, Acar N, Kilic B. Rh Subgroups and Kell Antigens in Patients With Thalassemia and in Donors in Turkey. Tr J of Medical Sciences 1999; 29; 155-7 [Abstract].

14- Racial and ethnic distribution of ABO blood types blood book.com. Availablr from: URL: http://www.bloodbook.com/world-abo.html#TOP.

15- Castilho L, Rios M, Pellegrino JJr, Carvalho MHM, Alberto FL, Saad S, *et al*. Genotyping of Kell, Duffy, Kidd and RHD in patients with Beta Thalassemia . Rev Bras Hematol 2000; 22(2): 69-76.

16- The Blood Group Antigen Gene Mutation Database. Available from: URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mhc/xslcgi.fcgi?cmd=bgmut/systems_info&system=duffy.

17- Hillyer CD, Shaz BH, Winkler AM, Reid M. Integrating molecular technologies for red blood cell typing and compatibility testing into blood centers and transfusion services. Transfus Med Rev 2008; 22(2): 117-32.

Archive of SID

www.SID.ir

Molecular blood genotyping in patients with Thalassemia major in Tehran Adult Thalassemic Clinic

Shaiegan M.[1](PhD), Samiee Sh.[1](MS), Azarkeivan A.[1,2](MD), Daneils J.[3](PhD), Martin P.[3](MS), Ataiee Z.[1](BS), Lotfi P.[1](BS), Kavari M.[1](BS), Lotfi H.[1](BS), Kasraiean L.[1,4](MD)

[1]*Iranian Blood Transfusion Organization, Research Center, Tehran, Iran*
[2]*Tehran Adult thalassemia Clinic,Iran*
[3]*England Blood Transfusion Organization, Bristol, UK*
[4]*Shiraz Regional Educational Blood Transfusion Center, Iran*

Abstract

Background and Objectives

Blood typing by serologic methods after transfusion has limitations due to presence of donor red cells in recipients. Accurate determination of red blood cells (RBCs) antigens is very important in multitransfused patients including beta-thalassemics and sickle cell anemics. So, the aim of this study was to evaluate DNA- based methods as supplement to the hemagglutination technique to determine the red blood cell (RBC) antigen profile of multitransfused patients with beta- thalassemia.

Materials and Methods

DNA was extracted from peripheral blood of 20 apparently normal people and 44 patients including 35 with beta- thalassemia (out of whom 19 had clinical evidence of delayed hemolytic transfusion reaction) , 8 with thalassemia intermedia (out of whom 2 had hemolytic reaction), and one with sickle cell thalassemia. RHD/ RHC/ RHc/ RHE/ RHe/ JKA/ JKB/ FYA/ FYB/ KELL1/ KELL2 alleles were determined by PCR and were then compared with the hemagglutination method.

Results

Phenotype and genotype results were the same in all controls. The phenotypes and genotypes of 53 blood antigens of 26 patients were incompatible. Most of the discrepancies (19 cases) occurred in the Rh system, and fifteen in the Duffy and Kidd systems.

Conclusions

The results show that screening platelet concentrates for bacterial contamination is necessary for blood transfusion centers and hospital blood banks. Blood typing by serologic method was not accurate in this study but genotyping could determine true blood groups in multitransfused patients and help in selection of RBCs without alloimmunized antigens in future transfusion attempts. Specificity, sensitivity, positive and negative predictive values of hemagglutination method for RhD antigen had good values in comparison to the molecular method. This might be due to pre- transfusion determination of RhD for thalassemic patients so as to receive Rh- matched blood units. It seems pre-transfusion blood typing of Rh and Kell antigens, which are the cause of hemolytic reactions, in comparison to the molecular method could be cost effective. In addition, typing of Rh and Kell antigens in some regular blood donors could be helpdul for selecting antigen-negative RBCs for transfusion dependent patients

Key words: Thalassemia, Polymerase Chain Reaction, Blood group antigens

SJIBTO 2009; 6(2): 107-115
Received: 13 Nov 2008
Accepted:10 Aug 2009

Correspondence: Shaiegan M., PhD of Immunology. Iranian Blood Transfusion Organization-Research Center. P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821)82052194; Fax: (+9821)88601599
E-mail: *m.shaiegan@ibto.ir*

Archive of SID
www.SID.ir