Archive of SID

خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۶ شماره ۴ زمستان ۹۸ (۲۶۹-۲۵۹)

مقاله پژوهشی

بررسی ژنوتیپ سیستم گروه خونی Kell در بیماران تالاسمی دارای آلوآنتی‌بادی

ریحانه صریحی[۱]، ناصر امیری‌زاده[۲]، آرزو اودی[۳]

چکیده

سابقه و هدف

آلوایمیونیزاسیون، برجسته‌ترین عارضه بالینی در بیماران تالاسمی محسوب می‌گردد و Anti-K فراوان‌ترین آنتی‌بادی در این بیماران می‌باشد. لذا ارزیابی دقیق این آنتی‌ژن می‌تواند سبب کاهش چشمگیر موارد آلو-ایمیونیزاسیون گردد. روش‌های ژنوتیپ با غلبه بر محدودیت‌های روش سرولوژیک، سبب تسهیل تعیین گروه در این بیماران شده و می‌تواند راهنمای خوبی جهت شناسایی واحدهای خون سازگار باشد. در این بررسی آنتی‌ژن‌های K و k با روش‌های سرولوژیک و مولکولی بررسی شده و نتایج مورد مقایسه قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی، تعداد ۲۰۰ نمونه خون کامل به صورت تصادفی از بیماران تالاسمی دارای آلوآنتی-بادی درمانگاه تالاسمی بزرگسالان ظفر جمع‌آوری و فنوتیپ آنتی‌ژن‌های K و k برای تمامی نمونه‌ها تعیین گردید. PCR-SSP برای تمامی نمونه‌ها انجام شد. در موارد عدم تطابق نتایج ژنوتیپ و سرولوژی، نتایج به وسیله PCR-RFLP و تعیین توالی DNA تایید شدند.

یافته‌ها

در این مطالعه Anti-K (۲۸٪) شایع‌ترین آنتی‌بادی شناخته شد. نتایج ژنوتیپ نشان داد که از ۲۰۰ نمونه مورد بررسی، ۱۹۲ بیمار(۹۶٪) دارای ژنوتیپ KEL*02/KEL*02 و ۸ بیمار(۴٪) KEL*01/KEL*02 بودند. با مقایسه نتایج ژنوتیپ و فنوتیپ، ۸ مورد ناسازگاری مشاهده شد که در تمامی موارد صحت نتایج ژنوتیپ با تعیین توالی DNA تایید گردید.

نتیجه گیری

این مطالعه نشان داد که آنتی‌بادی‌ها علیه آنتی‌ژن K هم چنان در بیماران تالاسمی به میزان بالایی پیدا می‌شود. یافته‌ها بیان نمود که ژنوتیپ مولکولی RBC نسبت به فنوتیپ سرولوژیک برتری دارد و به خصوص در بیمارانی مانند بیماران تالاسمی که دفعات زیادی خون می‌گیرند، جایگزین مناسب و روش قابل اعتمادتری است.

کلمات کلیدی: ژنوتیپ، سیستم گروه خونی Kell، تالاسمی

تاریخ دریافت: ۹۸/۳/ ۱
تاریخ پذیرش: ۹۸/۵/۲۷

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۲- PhD خون‌شناسی و بانک خون ـ دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۲- مؤلف مسئول: PhD خون‌شناسی و بانک خون ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵

www.SID.ir

Downloaded from bloodjournal.ir at 11:31 +0330 on Monday February 17th 2020

Archive of SID

Downloaded from bloodjournal.ir at 11:31 +0330 on Monday February 17th 2020

مقدمه

بیماری تالاسمی به عنوان یکی از شایع‌ترین بیماری‌های ژنتیکی در جهان، تقریباً در تمامی نژادها و در حدود ۶۰ کشور جهان دیده می‌شود(۱). طبق گزارش‌های سازمان جهانی بهداشت، حدوداً ۲ تا ۳ میلیون نفر در داخل کشور ناقل این بیماری بوده و بیش از ۱۸ هزار بیمار، مبتلا به انواع شدید آن می‌باشند که نیازمند تزریق خون مکرر بوده و بیشترین دریافت‌کنندگان سالیانه فرآورده‌های خونی را در کشور تشکیل می‌دهند(۳، ۲). آلوایمیونیزاسیون برجسته‌ترین عارضه بالینی ناشی از تزریق خون مکرر در بیماران تالاسمی است، چرا که آلوایمیونیزاسیون در این بیماران سبب افزایش نیاز به تزریق خون شده و شناسایی واحدهای خونی سازگار جهت تزریق خون‌های بعدی را نیز با مشکل مواجه می‌سازد(۶-۴). هم چنین افرادی که یک آلوآنتی‌بادی در آن‌ها ایجاد می‌شود دارای خطر بالاتری برای تولید اتوآنتی‌بادی‌ها و آلوآنتی‌بادی‌های بیشتر به دنبال تزریق خون‌های بعدی هستند که این امر می‌تواند فرآیند شناسایی خون سازگار را در این بیماران با مشکل مواجه ساخته، سبب تاخیر در فرآیند تأمین و تزریق خون سازگار گردد و مدیریت درمان را به یک چالش جدی تبدیل کند(۹-۷، ۴). هم چنین تولید آلوآنتی‌بادی‌ها در بیماران مؤنثی که در سن باروری هستند می‌تواند فرآیند بارداری را در این بیماران با مشکل مواجه سازد(۱۰).

کلیدی‌ترین راه‌کار در کاهش میزان آلوایمیونیزاسیون، پیشگیری از وقوع آن با استفاده از فرآورده با سازگاری بیشتر است که این امر مستلزم تعیین دقیق گروه‌های خونی در بیماران می‌باشد(۱۱، ۹، ۶). سیستم گروه خونی Kell پس از ABO و Rh مهم‌ترین سیستم گروه خونی در زمینه انتقال خون محسوب می‌گردد(۱۲). آنتی‌ژن‌های موجود در این سیستم گروه خونی به شدت ایمونوژن بوده و سبب برانگیختن شدیدترین واکنش‌ها به دنبال انتقال خون ناسازگار می‌شوند(۱۳). در میان تمامی آنتی‌ژن‌های موجود در سیستم گروه خونی Kell ، دو آنتی‌ژن متضاد K و k دارای بیشترین اهمیت بالینی می‌باشند. آنتی‌ژن K به عنوان ایمونوژن‌ترین آنتی‌ژن در این سیستم گروه خونی شناخته شده و در بین سایر گروه‌های خونی نیز پس از آنتی‌ژن RhD بیشترین ایمونوژنیسیته را دارا می‌باشد(۱۴، ۱۲). این آنتی‌ژن جفت متضاد آنتی‌ژن k بوده و یکی از شایع‌ترین علل ساخت آلوآنتی‌بادی به دنبال تزریق خون ناسازگار است(۱۵، ۱۲). لذا تعیین دقیق این آنتی‌ژن‌ها در بیماران تالاسمی می‌تواند موارد آلوایمیونیزاسیون را به صورت چشمگیری کاهش داده و سبب بهبود و ارتقای فرآیندهای درمانی در این بیماران گردد(۱۶). روش‌های سرولوژی، روش‌هایی ساده و نسبتاً ارزان جهت تعیین گروه‌های خونی هستند. این روش‌ها در صورتی که به درستی انجام شوند در بسیاری از موارد بالینی کمک‌کننده خواهند بود(۱۷). با این وجود این روش‌ها دارای محدودیت‌های بسیاری به ویژه در تعیین گروه برای بیماران دارای تزریق خون مکرر هستند(۱۸).

روش‌های سرولوژیک در تعیین گروه خونی افرادی که به تازگی خون دریافت نموده‌اند به دلیل حضور گلبول‌های قرمز دهنده در گردش خون گیرنده ناکارآمد هستند و یا در مواردی که گلبول‌های قرمز به صورت متصل به آلوآنتی بادی و یا DAT مثبت در گردش خون بیمار حضور دارند، به دلیل تداخلات گسترده آنتی‌بادی‌ها این روش‌ها قادر به تعیین صحیح فنوتیپ در بیماران نمی‌باشند(۱۹، ۱۸، ۴).

روش‌های ژنوتایپینگ با استفاده از تجزیه و تحلیل DNA ژنومی قادر هستند با غلبه بر محدودیت‌های روش‌های سرولوژیک، گروه‌های خونی را در بیماران دارای انتقال خون اخیر، بیماران با تداخلات گسترده آنتی‌بادی‌ها و یا در موارد عدم دسترسی به آنتی‌سرم‌ها با دقت بالایی تعیین نمایند و موارد عدم انطباق را در آزمایش‌های سرولوژیک حل کنند(۲۰).

هم چنین این روش‌ها قادر به شناسایی واریانت‌های گروه‌های خونی، آنتی‌ژن‌های با بیان ضعیف و فنوتیپ‌های Null می‌باشند که با استفاده از روش‌های سرولوژیک ممکن نبود(۲۱). به این منظور در این مطالعه دو آنتی‌ژن K و k (آلل‌های KEL*01 و KEL*02) از سیستم گروه خونی Kell در بیماران تالاسمی دارای آلوآنتی‌بادی از طریق تجزیه و تحلیل مولکولی با روش‌های PCR-SSP، PCR-RFLP و تعیین توالی DNA بررسی گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from bloodjournal.ir at 11:31 +0330 on Monday February 17th 2020

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه:

در یک مطالعه توصیفی، با استفاده از اطلاعات موجود در پرونده بیماران تالاسمی مراجعه کننده به درمانگاه تالاسمی بزرگسالان ظفر، تعداد ۲۰۰ بیمار تالاسمی دارای آلوآنتی‌بادی انتخاب گردید. سپس از هر بیمار مقدار ۵ میلی‌لیتر نمونه خون کامل EDTA دار جمع‌آوری شد.

آزمایش‌های سرولوژیک:

ابتدا سوسپانسیون ۵٪-۳٪ (در سرم فیزیولوژی) گلبول‌های قرمز بیماران تهیه و سپس کلیه نمونه‌ها با استفاده از آنتی-K و آنتی-k (GmbH ایمونودیاگنوستیکا) تعیین فنوتیپ شدند. ابتدا مطابق دستورالعمل شرکت سازنده، آنتی‌سرم را به هر لوله آزمایش افزوده و لوله‌ها به مدت ۱۵ الی ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس هر لوله سه مرتبه با استفاده از سالین سرد شسته شده و دو قطره AHG (ایران، IBRF) به هریک از لوله‌ها اضافه شد. پس از سانتریفوژ، وجود یا عدم وجود آگلوتیناسیون و درجه‌بندی واکنش‌ها با استفاده از آینه مقعر ارزیابی و ثبت گردید.

غربالگری و تعیین هویت آنتی‌بادی‌ها بر اساس استانداردهای مرجع سازمان انتقال خون ایران و با استفاده از کیت‌های ارسالی از این مرکز انجام شد و نتایج ثبت گردید.

استخراج DNA:

به منظور استخراج DNA از خون کامل یا بافی کوت، از Nucleic Acid purification kit (ایران، یکتا تجهیز آزما) استفاده شد. جهت اطمینان از کیفیت نمونه‌های استخراج شده، غلظت DNA استخراج شده با قرائت جذب نوری توسط دستگاه نانو دراپ مورد بررسی قرار گرفت و نمونه‌ها در فریزر ۲۱- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

*روش PCR-SSP جهت تعیین آلل‌های KEL*01 و KEL*02:*

بر روی کلیه نمونه‌ها پس از استخراج DNA با استفاده از آغازگرهای به دست آمده از مقاله ژانگ بوئر و همکارانش در سال ۲۰۱۲ ، آزمایش مولکولی(Sequence specific primer) PCR-SSP انجام شد(جدول ۱). جهت کنترل از هورمون رشد انسانی استفاده گردید. حجم کلی واکنش PCR ، ۲۵ µL و شامل: ۱۲/۵ µL از Master Mix 2X PCR (ایران، یکتا تجهیز آزما)، غلظت ۶۰ نانوگرم DNA و آغازگر جلو برنده و معکوس ۰/۰۳۵ میکرومولار بود. سپس طبق برنامه دمایی زیر در دستگاه ترمال سایکلر مراحل تکثیر انجام شد: ۱ چرخه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه و ۳۰ چرخه(در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه) و ۱ چرخه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه. پس از انجام واکنش PCR ، محصولات به دست آمده با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد بررسی شدند.

*روش PCR-RFLP جهت تعیین آلل‌های KEL*01 و KEL*02:*

جهت تایید ژنوتیپ بیمارانی که دارای تناقض در بین نتایج فنوتیپ و ژنوتیپ بودند،(Restriction fragment length polymorphism)PCR-RFLP با استفاده از آغازگرهای به دست آمده از مقاله آرونی و همکارانش در سال ۲۰۱۳ و آنزیم محدودالاثر Bsm I (Thermo scientific, US) انجام شد(جدول ۱). حجم کلی واکنش PCR، ۲۵ µL و شامل: ۱۲/۵ µL از Master Mix 2X PCR) (یکتا تجهیز آرما، ایران) غلظت ۱۰۰ نانوگرم DNA و آغازگر جلوبرنده و معکوس ۰/۰۴ میکرومولار بود. سپس طبق برنامه دمایی زیر در دستگاه ترمال سایکلر مراحل تکثیر انجام شد: ۱ چرخه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و ۳۲ چرخه (در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه) و ۱ چرخه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ دقیقه. پس از انجام واکنش PCR ، محصولات به دست آمده طبق دستورالعمل آنزیم Bsm I تحت تاثیر آنزیم قرار داده شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا آنزیم

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from bloodjournal.ir at 11:31 +0330 on Monday February 17th 2020

جدول ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده جهت بررسی مولکولی آلل‌های KEL*01 و KEL*02

روش مولکولی	آنتی‌ژن	جلوبرنده/معکوس	توالی آغازگر	طول قطعه	منبع
PCR-SSP	K	جلوبرنده	ACTCATCAGAAGTCTCAGCA	۳۶۰ bp	(۲۲)
		معکوس	CTAGAGGGTGGGTCTTCTTCC		
	K	جلوبرنده	CTCATCAGAAGTCTCAGCG	۳۶۰ bp	
		معکوس	CCAAGGCCAAGTGTCAGTGC		
PCR-RFLP	K/k	جلوبرنده	AAGCTTGGAGGCTGGCGCAT	۱۵۶ bp	(۲۳)
		معکوس	CCTCACCTGGATGACTGGTG		
DNA Sequencing	K/k	جلوبرنده	TTTAGTCCTCACTCCCATGCTTCC	۷۴۰ bp	(۲۴)
		معکوس	TATCACACAGGTGTCCTCTCTTCC		

محصول مورد نظر را به طور کامل برش دهد. سپس محصولات برش خورده با استفاده از ژل آگارز ۴ درصد تفکیک شدند. محصول اولیه حاصل از PCR در افراد دارای آلل شایع k فاقد جایگاه برش برای آنزیم می‌باشد اما در افراد حامل آلل K ، جایگزینی نوکلئوتیدی سبب ایجاد یک جایگاه برش آنزیم در این ناحیه شده و سبب می‌شود تا محصول اولیه حاصل از تکثیر به طول ۱۵۶ bp تحت تاثیر آنزیم به دو قطعه‌ی ۱۰۰ و ۵۶ bp برش داده شود. در حقیقت وجود قطعات ۱۰۰ و ۵۶ bp پس از اثر آنزیم، نمایانگر وجود آلل K در بیمار می‌باشد. در افرادی که هر دو آلل را به صورت هتروزیگوت دارا می‌باشند شاهد حضور هم زمان قطعات برش نخورده به طول ۱۵۶ bp و قطعات ۱۰۰ bp و ۵۶ bp حاصل از برش آنزیم خواهیم بود.

تعیین توالی DNA (DNA Sequencing):

به منظور تایید آزمایش‌های مولکولی PCR-SSP و PCR-RFLP و تایید وجود موتاسیون در ناحیه مربوطه، در مواردی که در بین نتایج فنوتیپ و ژنوتیپ تناقض وجود داشت و هم چنین در ۵۰ نمونه به عنوان کنترل، اگزون شماره ۶ از لکوس ژنی Kell که حاوی SNP مرتبط با آنتی‌ژن‌های K و k می‌باشد تکثیر، و جهت تعیین توالی ارسال گردید. آغازگرهای تکثیر اگزون از مقاله لی و همکارانش در سال ۱۹۹۵ برداشت شد و طبق برنامه دمایی زیر در دستگاه ترمال سایکلر مراحل تکثیر انجام گردید: ۱ چرخه(در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه) و ۲۷ چرخه (در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه در ۶۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه) و ۱ چرخه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه (جدول ۱). حجم کلی واکنش PCR، ۵۰ µL و شامل: µL ۲۵ از Master Mix 2X PCR (ایران، یکتا تجهیز آزما)، غلظت ng ۲۰۰ DNA و آغازگر جلوبرنده و معکوس ۰/۰۲ میکرومولار بود. نتیجه تعیین توالی با برنامه کروماس بررسی شد و با مشاهده موتاسیون و مکان‌یابی آن، نوع آلل در بیماران تعیین گردید.

یافته‌ها

مشخصات بیماران:

در این مطالعه ۲۰۰ بیمار تالاسمی دارای آلوآنتی‌بادی شامل ۸۱ (۴۰/۵٪) بیمار مذکر و ۱۱۹ (۵۹/۵٪) بیمار مؤنث با میانگین سنی ۱۰/۹± ۳۰ سال(رنج سنی ۶۵-۴ سال) مورد بررسی قرار گرفتند که از این بین ۱۰۸(۵۴٪) بیمار تالاسمی ماژور، ۹۰ (۴۵٪) بیمار اینترمدیا و ۲ (۱٪) بیمار مبتلا به سیکل/ بتاتالاسمی بودند.

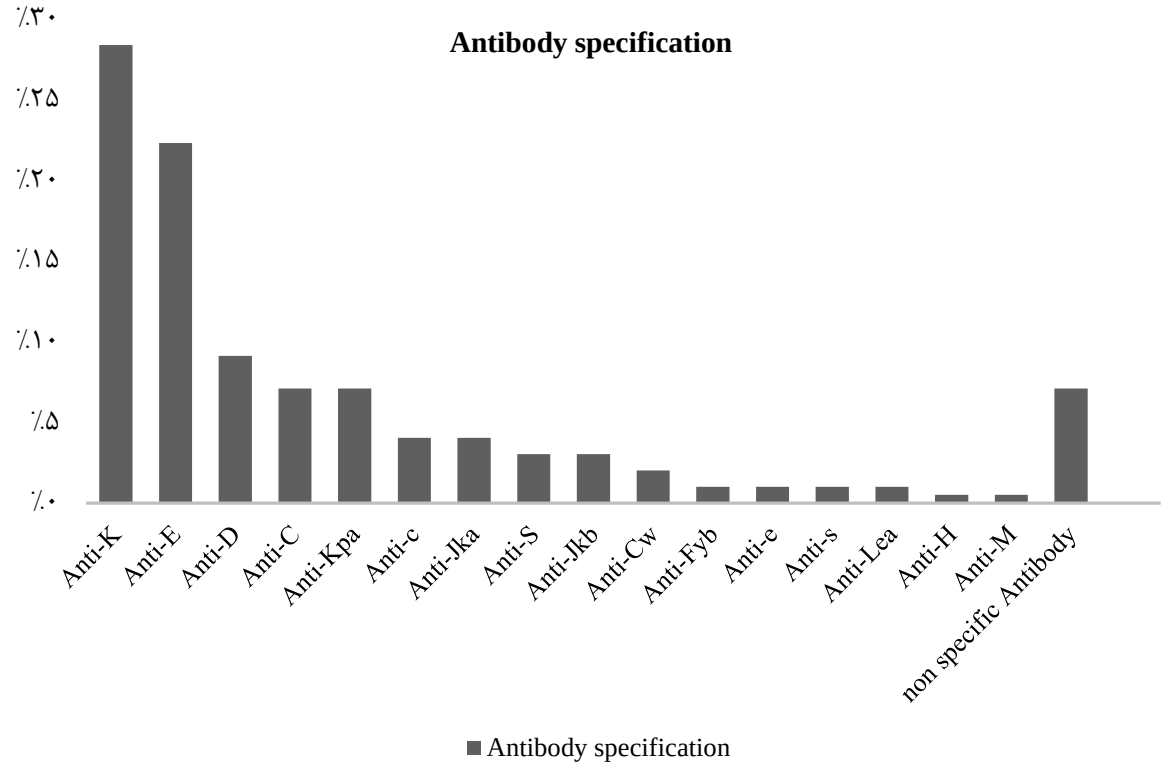
نتایج مربوط به تعیین نوع آلوآنتی‌بادی‌ها در جمعیت مورد بررسی:

در این بررسی انواعی از آلوآنتی‌بادی‌ها در سرم بیماران شناسایی گردید(نمودار ۱).

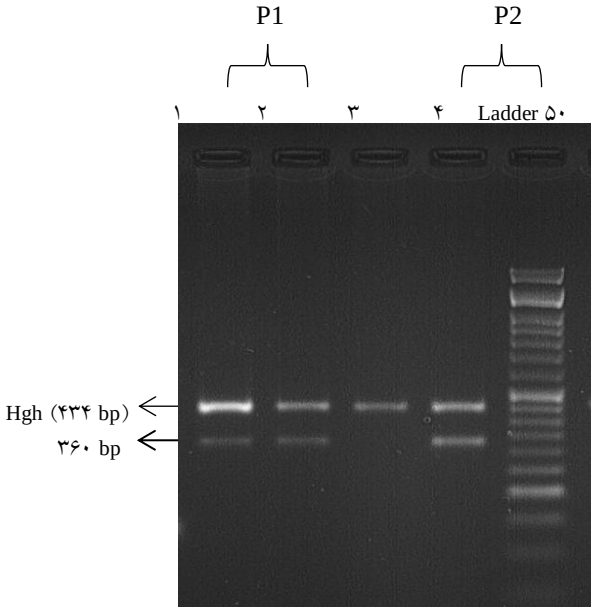
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from bloodjournal.ir at 11:31 +0330 on Monday February 17th 2020



نمودار ۱: درصد فراوانی آلوآنتی بادی‌ها در بیماران مورد مطالعه

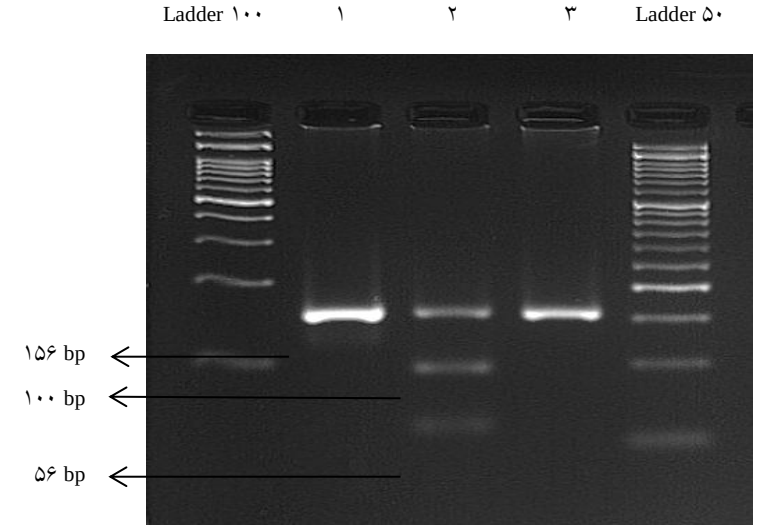


شکل۱: نمونه‌ای از نتایج PCR-SSP در ۲ بیمار دارای ژنوتیپ KEL*01/KEL*02 و KEL*02/KEL*02: ناحیه باند در ارتباط با آلل‌های KEL*01 و KEL*02 ۳۶۰bp است. از آغازگر هورمون رشد انسانی به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید که باند آن ۴۳۴bp می‌باشد. ستون‌های ۱و ۲ به ترتیب مربوط به آلل‌های KEL*01 و KEL*02 برای بیمار شماره ۱ و ستون‌های ۳ و ۴ نیز به ترتیب مربوط به همین آنتی‌ژن‌ها برای بیمار شماره ۲ می‌باشند و لذا ژنوتیپ بیمار ۱، KEL*01/KEL*02 (هتروزیگوت) و ژنوتیپ بیمار ۲ به صورت KEL*02/KEL*02 (هموزیگوت) است.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from bloodjournal.ir at 11:31 +0330 on Monday February 17th 2020



شکل۲: نمونه‌ای از نتایج PCR-RFLP در دو بیمار دارای ژنوتیپ KEL*01/KEL*02 و KEL*02/KEL*02: ستون ۱باند اولیه حاصل از PCR را پیش از تاثیر آنزیم به طول bp ۱۵۶ نمایش می‌دهد. ستون‌های ۲ و ۳ باندهای حاصل از الکتروفورز محصولات PCR را پس از اثر آنزیم به ترتیب در افراد دارای ژنوتیپ هتروزیگوت KEL*01/KEL*02 و هموزیگوت KEL*02/KEL*02 نشان می‌دهند.

شایع‌ترین آنتی‌بادی‌ها به ترتیب شامل Anti-Kell (۲۸٪)، Anti-E (۲۲٪)، Anti-D (۹٪) و Anti-Kpa (۷٪) می‌باشند. هم چنین در جمعیت مورد مطالعه ۵٪ از بیماران علاوه بر آلوآنتی‌بادی دارای اتوآنتی‌بادی(Warm & Cold auto antibody) بودند.

نتایج تعیین فنوتیپ برای آنتی‌ژن‌های K و k:

در ارتباط با آنتی‌ژن‌های K و k ، فنوتیپ K^-k^+ با ۹۶/۳۶٪ دارای بیشترین فراوانی بوده و پس از آن فنوتیپ K^+k^+ با ۱/۸۲٪ قرار می‌گیرد. هم چنین فنوتیپ‌های K^+k^- و K^-k^- نیز هریک در ۰/۶٪ از جمعیت دیده شدند. آنتی‌ژن K در ۱/۵٪ از جمعیت و آنتی‌ژن k در ۹۸/۵٪ از جمعیت مشاهده گردید.

نتایج مربوط به آزمایش مولکولی PCR-SSP:

از میان ۲۰۰ بیمار مورد بررسی۹۶٪ بیماران دارای ژنوتیپ KEL*02/KEL*02 و ۴٪ از بیماران دارای ژنوتیپ KEL*01/KEL*02 بودند. آلل KEL*01 در ۸ بیمار(۴٪)، و آلل KEL*02 در تمامی بیماران(۱۰۰٪) دیده شد(شکل ۱).

نتایج مربوط به آزمایش مولکولی PCR-RFLP:

روش PCR-RFLP بر روی نمونه‌های دارای تناقض بین نتایج به دست آمده از روش‌های سرولوژیک و ژنوتیپ انجام شد تا به این وسیله نتایج به دست آمده از PCR-SSP تأیید گردند. افراد دارای آلل k فاقد جایگاه برش برای آنزیم Bsm I می‌باشند اما در افراد حامل آلل K جایگزینی نوکلئوتیدی سبب ایجاد یک جایگاه برش آنزیم شده و سبب می‌شود تا محصول اولیه حاصل از تکثیر به طول bp ۱۵۶ تحت تاثیر آنزیم به دو قطعه bp ۱۰۰ و bp ۵۶ برش داده شود. در افرادی که هر دو آلل را به صورت هتروزیگوت دارا می‌باشند، شاهد حضور هم‌زمان قطعات برش نخورده به طول bp ۱۵۶ و قطعات bp ۱۰۰ و bp ۵۶ حاصل از برش آنزیم خواهیم بود(شکل ۲).

نتایج مربوط به تعیین توالی اگزون ۶ از لکوس ژنی Kell:

به منظور تأیید نتایج به دست آمده از آزمایش‌های مولکولی PCR-SSP و PCR-RFLP و تأیید وجود SNP مربوطه، تعیین توالی برای اگزون ۶ از نمونه‌هایی که دارای ناسازگاری بین نتایج فنوتیپ و ژنوتیپ بودند و هم چنین

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from bloodjournal.ir at 11:31 +0330 on Monday February 17th 2020

تعداد ۵۰ نمونه به عنوان کنترل انجام شد. سپس نتایج حاصل از تعیین توالی با استفاده از نرم‌افزار کروماس بررسی شدند. در این مطالعه هیچ گونه عدم انطباقی در بین نتایج به دست آمده از روش‌های PCR-SSP ، PCR-RFLP و DNA Sequencing دیده نشد و تمامی آزمایش‌های مولکولی مؤید یکدیگر بودند.

نتایج حاصل از مقایسه نتایج آزمایش‌های سرولوژی و روش مولکولی:

در بین نتایج به دست آمده از ژنوتیپ و روش‌های سرولوژی در ۸ مورد عدم انطباق مشاهده شد(جدول ۲). بیشترین موارد عدم انطباق در این بررسی مربوط به ژنوتیپ KEL*01/KEL*02 و فنوتیپ K^-k^+ با ۶ مورد ناسازگاری بود.

جدول ۲: موارد عدم انطباق نتایج سرولوژی و ژنوتیپ

تعداد موارد	نتایج سرولوژی	نتایج ژنوتیپ
۶	K^-k^+	KEL*01/KEL*02
۱	K^+k^-	KEL*02/KEL*02
۱	K^-k^-	KEL*02/KEL*02

بحث

نتایج به دست آمده از آزمایش تعیین هویت آنتی‌بادی‌ها در این مطالعه نشان داد که شایع‌ترین آلوآنتی‌بادی‌ها در این بررسی به ترتیب شامل Anti-Kell (۲۸٪)، Anti-E (۲۲٪)، Anti-D (۹٪) و Anti-Kpa (۷٪) می‌باشند. هم چنین نتایج ژنوتیپ در این مطالعه نشان داد که از میان ۲۰۰ نمونه مورد بررسی، ۹۶٪ بیماران دارای ژنوتیپ KEL*02/KEL*02 و ۴٪ از بیماران دارای ژنوتیپ KEL*01/KEL*02 بودند و هیچ موردی از سایر ژنوتیپ‌های محتمل در جمعیت مورد بررسی دیده نشد. با مقایسه نتایج به دست آمده از ژنوتیپ و فنوتیپ، ۸ مورد ناسازگاری در بین نتایج مشاهده شد که از این بین ۶ بیمار دارای ژنوتیپ KEL*01/KEL*02 و فنوتیپ K^-k^+ بودند.

مطالعه‌های متعددی در ارتباط با شیوع آلوآنتی‌بادی‌ها در کشورهای مختلف اروپایی و آسیایی صورت گرفته است که در غالب این مطالعه‌ها Anti-K و Anti-E فراوان‌ترین آنتی‌بادی‌ها هستند(۲۸-۲۵). در داخل کشور نیز مطالعه‌های بسیاری به صورت منطقه‌ای و یا چند مرکزی صورت گرفته است که در اغلب این مطالعه‌ها همانند نتایج به دست آمده در این تحقیق، Anti-K به عنوان فراوان‌ترین آنتی‌بادی در جمعیت بیماران تالاسمی شناخته شده است. در سال ۲۰۰۷ کریمی و همکاران در مطالعه‌ای میزان آلوایمیونیزاسیون را در جنوب ایران مورد مطالعه قرار دادند که در این بررسی شایع‌ترین آلوآنتی-بادی‌ها به ترتیب Anti-Kell(۵۰٪) ، Anti-D(۱۵٪) و Anti-E(۱۰٪) عنوان شد(۲۹). هم چنین در سال ۲۰۱۱ آذرکیوان و همکاران در مطالعه‌ای چند مرکزی میزان آلوایمیونیزاسیون را مورد مطالعه قرار دادند که در این بررسی نیز Anti-K با ۳۳/۷٪ شایع‌ترین آنتی‌بادی شناخته شد(۳۰). در سال ۲۰۱۶ نیز داوری و همکارانش به بررسی میزان آلوایمیونیزاسیون در استان زنجان پرداختند که در این مطالعه نیز Anti-K و Anti-E به ترتیب شایع‌ترین آلوآنتی‌بادی‌ها در بیماران تالاسمی این استان بودند(۳۱). تعدادی از مطالعه‌ها نیز شیوع بیشتر سایر آنتی‌بادی‌ها را گزارش نموده‌اند. به عنوان مثال صادقیان و همکاران در سال ۲۰۰۹ میزان آلوایمیونیزاسیون را در شمال شرق ایران مورد بررسی قرار دادند که در این مطالعه بیشترین شیوع آلوآنتی‌بادی مربوط به(۸۸٪) Anti-D و سپس Anti-C و Anti-E بوده است(۳۲). هم چنین در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۱۳، میرزائیان و همکاران میزان آلوایمیونیزاسیون را در جنوب شرق ایران مورد بررسی قرار دادند که در این بررسی نیز آلوآنتی‌بادی‌های ضد آنتی‌ژن‌های سیستم Rh و سپس آنتی‌بادی‌های ضد آنتی‌ژن‌های سیستم گروه خونی Kell شایع‌ترین آلوآنتی‌بادی‌ها بودند(۳۳). اما به طور کلی می‌توان گفت در اغلب نقاط ایران آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن K شایع‌ترین آنتی‌بادی در بیماران تالاسمی می‌باشد و لذا ارزیابی دقیق این آنتی‌ژن و بررسی سازگاری آن پیش از تزریق خون در بیماران تالاسمی می‌تواند موارد آلوایمیونیزاسیون را در این بیماران کاهش داده و سبب بهبود فرآیندهای درمانی در این بیماران گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from bloodjournal.ir at 11:31 +0330 on Monday February 17th 2020

نتایج ژنوتیپ در این مطالعه نشان داد که از میان ۲۰۰ نمونه مورد بررسی، ۹۶٪ بیماران دارای ژنوتیپ KEL*02/KEL*02 و ۴٪ از بیماران دارای ژنوتیپ KEL*01/KEL*02 بودند و هیچ موردی از سایر ژنوتیپ‌های محتمل در جمعیت مورد بررسی ما دیده نشد. این نتایج اگر چه متفاوت از نتایج به دست آمده با روش‌های سرولوژی می‌باشد اما به عدد به دست آمده برای شیوع آنتی‌ژن K در مطالعه آذرکیوان و همکارانش در سال ۲۰۱۶ که بر روی ۱۱۵۵۷ اهداکننده انجام گردید، (۳/۸٪) بسیار نزدیک می‌باشد(۳۴). این امر می‌تواند تأییدی بر صحت نتایج به دست آمده از روش ژنوتایپ در مقابل روش‌های سرولوژی باشد.

در مطالعه مشابهی که در سال ۲۰۱۰ توسط گوئل‌سین و همکارانش در بیماران با تزریق خون مکرر در جنوب برزیل انجام شد، درصد شیوع ژنوتیپ KEL*02/KEL*02 ۹۴/۷۵٪ ، KEL*01/KEL*02 ۵٪ و KEL*01/KEL*01 ۰/۲۵٪ گزارش گردید(۱۱). در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۱۳ توسط باکانی و همکارانش در بیماران با تزریق خون مکرر انجام شد نیز اعداد مشابهی به دست آمد و ۹۴/۸۷٪ از بیماران دارای ژنوتیپ KEL*02/KEL*02 و ۵/۱۲٪ دارای ژنوتیپ KEL*01/KEL*02 بودند(۱۷).

در سال ۲۰۱۶ نیز عثمان و همکارانش بررسی مشابهی را در بیماران تالاسمی با تزریق خون مکرر انجام دادند که در آن بر خلاف آن چه در مطالعه ما به دست آمده بود، ۱۰۰٪ بیماران دارای ژنوتیپ KEL*02/KEL*02 بودند (۳۵).

با مقایسه نتایج به دست آمده از ژنوتیپ و فنوتیپ در بیماران مورد مطالعه ما، ۸ مورد ناسازگاری در بین نتایج مشاهده گردید که برای تمامی این موارد به منظور تأیید نتایج به دست آمده، PCR-RFLP و Sequencing انجام شد. از میان موارد عدم انطباق؛ ۶ بیمار دارای ژنوتیپ KEL*01/KEL*02 و فنوتیپ K^-k^+ ، ۱ بیمار دارای ژنوتیپ KEL*01/KEL*02 و فنوتیپ K^-k^- و ۱ بیمار نیز دارای ژنوتیپ KEL*02/KEL*02 و فنوتیپ K^+k^- بودند. در این بررسی هیچ گونه عدم انطباقی در بین نتایج به دست آمده از روش‌های PCR-SSP، PCR-RFLP و DNA Sequencing دیده نشد و نتایج به دست آمده از تمامی روش‌های مولکولی کاملاً با یکدیگر مطابقت داشتند. مطالعه‌های مشابه بسیاری در این زمینه صورت گرفته است.

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۰ توسط گوئل‌سین و همکارانش در بیماران با تزریق خون مکرر در جنوب برزیل انجام شد و هم چنین در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۳ توسط باکانی و همکارانش در بیماران دارای تزریق خون مکرر صورت گرفت، با مقایسه نتایج به دست آمده از فنوتیپ و ژنوتیپ به ترتیب ۱ و ۲ مورد ناسازگاری در نتایج دیده شد که در ارتباط با هر دو مطالعه موارد ناسازگاری دارای ژنوتیپ KEL*01/KEL*02 و فنوتیپ K^-k^+ بودند(۱۷، ۱۱).

در مطالعه ما نیز بیشترین موارد ناسازگاری را همین موارد تشکیل می‌دادند. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۶ توسط ژان و همکارانش صورت گرفت نیز یک مورد ناسازگاری مرتبط با سیستم گروه خونی Kell مشاهده شد که در این مورد بیمار دارای ژنوتیپ KEL*02/KEL*02 و فنوتیپ K^+k^+ بود(۶). در مطالعه ما ناسازگاری مشابهی دیده نشد. بر خلاف مطالعه ما و مطالعه‌هایی که اشاره شد، در بررسی که عثمان و همکارانش در سال ۲۰۱۶ در بیماران تالاسمی دارای تزریق خون مکرر انجام دادند، هیچ موردی از ناسازگاری بین نتایج ژنوتیپ و فنوتیپ در ارتباط با گروه خونی Kell دیده نشد(۳۵). لذا با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه ما و سایر مطالعه‌های مشابه، غالب موارد عدم انطباق مربوط به بیماران با ژنوتیپ KEL*01/KEL*02 و فنوتیپ K^-k^+ می‌باشد. به نظر می‌رسد در این بیماران با توجه به دریافت مکرر خون منفی از نظر آنتی‌ژن K ، این آنتی‌ژن با استفاده از روش‌های سرولوژیک قابل شناسایی نبوده است. این در حالی است که شناسایی این افراد می‌تواند سبب صرفه‌جویی در استفاده از واحدهای خونی K منفی شود که در حال حاضر به تعداد محدود در کشور ما قابل دسترسی می‌باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این مطالعه و سایر مطالعه‌های مشابه

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from bloodjournal.ir at 11:31 +0330 on Monday February 17th 2020

انجام شده در این زمینه، می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از روش‌های مولکولی به منظور بررسی ژنوتیپ آنتی‌ژن‌های K و k از سیستم گروه خونی Kell، همراه با بررسی‌های سرولوژیک با رفع نواقص این روش‌ها و شناسایی واریانت‌ها و آلل‌هایی که روش‌های سرولوژیک قادر به شناسایی آن‌ها نمی‌باشند، می‌تواند نقش مؤثری در بهبود مدیریت تزریق خون و انتخاب فرآورده‌های خونی مناسب برای تزریق به بیماران تالاسمی دارای آلوآنتی‌بادی، ایفا کند.

تشکر و قدردانی

از زحمات همکاران بخش ایمونوهماتولوژی ستاد مرکزی سازمان انتقال خون و پرسنل درمانگاه تالاسمی بزرگسالان ظفر که در این پژوهش ما را یاری کردند، صمیمانه سپاسگزاریم. این مقاله ماحصل طرح مصوب در مؤسسه ملی توسعه تحقیقات علوم پزشکی ایران با کد طرح ۹۴۲۶۴۴ مصوب سال ۱۳۹۵بوده و هزینه‌های آن از محل این مؤسسه تامین گردیده است.

References:

1- Khodaei GH, Farbod N, Zarif B, Saeidi M. Frequency of thalassemia in Iran and Khorasan Razavi. International Journal of Pediatrics 2013; 1(1): 45-50.
2- Chou ST, Liem RI, Thompson AA. Challenges of alloimmunization in patients with haemoglobinopathies. Br J Haematol 2012; 159(4): 394-404.
3- Dorgalaleh A, Gholami MS, Shokuhiyan M, Valikhani M, Moghaddam ES, Naderi M. Alloimmunization against Rh and Kell blood groups antigens is the main obstacle for blood transfusion in transfusion dependent thalassemia patients in Iran. Int J Case Rep Images 2017; 8(6): 358-63.
4- Matteocci A, Pierelli L. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease and in thalassaemia: current status, future perspectives and potential role of molecular typing. Vox Sang 2014; 106(3): 197-208.
5- Reid ME, Halter Hipsky C, Hue-Roye K, Hoppe C. Genomic analyses of RH alleles to improve transfusion therapy in patients with sickle cell disease. Blood Cells Mol Dis 2014; 52(4): 195-202.
6- Ye Z, Zhang D, Boral L, Liz C, May J. Comparison of Blood Group Molecular Genotyping to Traditional Serological Phenotyping in Patients with Chronic or Recent Blood Transfusion. Journal of Biosciences and Medicines 2016; 4(3): 1-8.
7- O'Suoji C, Liem RI, Mack AK, Kingsberry P, Ramsey G, Thompson AA. Alloimmunization in sickle cell anemia in the era of extended red cell typing. Pediatr Blood Cancer 2013; 60(9): 1487-91.
8- Yazdanbakhsh K, Ware RE, Noizat-Pirenne F. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease: pathophysiology, risk factors, and transfusion management. Blood 2012; 120(3): 528-37.
9- Kutner J, Mota M, Conti F, Castilho L. Blood genotyping for improved outcomes in chronic transfusion patients: current and future perspectives. International Journal of Clinical Transfusion Medicine 2014; 2: 65-72.
10- Zafari M, Kosaryan M. Marriage and child bearing in patients with transfusion-dependent thalassemia major. J Obstet Gynaecol Res 2014; 40(8): 1978-82.
11- Guelsin GAS, Sell AM, Castilho L, Masaki VL, Melo FC, Hashimoto MN, *et al*. Benefits of blood group genotyping in multi-transfused patients from the south of Brazil. J Clin Lab Anal 2010; 24(5): 311-6.
12- Lee S. The value of DNA analysis for antigens of the Kell and Kx blood group systems. Transfusion 2007; 47(1 Suppl): 32S-9S.
13- Yazdanbakhsh K, Lee S, Yu Q, Reid ME. Identification of a defect in the intracellular trafficking of a Kell blood group variant. Blood 1999; 94(1): 310-8.
14- Howard PR. Basic & Applied Concepts of Blood Banking and Transfusion Practices. 4th ed. Philadelphia: Elsevier; 2016. p. 148-53.
15- Gassner C, Degenhardt F, Meyer S, Vollmert C, Trost N, Neuenschwander K, *et al*. Low-frequency blood group antigens in Switzerland. Transfus Med Hemother 2018; 45(4): 239-50.
16- Casas J, Friedman DF, Jackson T, Vege S, Westhoff CM, Chou ST. Changing practice: red blood cell typing by molecular methods for patients with sickle cell disease. Transfusion 2015; 55(6pt2): 1388-93.
17- Bakanay SM, Ozturk A, Ileri T, Ince E, Yavasoglu S, Akar N, *et al*. Blood group genotyping in multi-transfused patients. Transfus Apher Sci 2013; 48(2): 257-61.
18- Monteiro F, Tavares G, Ferreira M, Amorim A, Bastos P, Rocha C, *et al*. Technologies involved in molecular blood group genotyping. ISBT Science Series 2011; 6(1): 1-6.
19- Belsito A, Magnussen K, Napoli C. Emerging strategies of blood group genotyping for patients with hemoglobinopathies. Transfus Apher Sci 2017; 56(2): 206-13.
20- Poole J, Daniels G. Blood group antibodies and their significance in transfusion medicine. Transfus Med Rev 2007; 21(1): 58-71.
21- Veldhuisen B, Van Der Schoot C, De Haas M. Blood group genotyping: from patient to high-throughput donor screening. Vox Sang 2009; 97(3): 198-206.
22- Jungbauer C, Hobel C, Schwartz D, Mayr W. High-throughput multiplex PCR genotyping for 35 red blood cell antigens in blood donors. Vox Sang 2012; 102(3):

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from bloodjournal.ir at 11:31 +0330 on Monday February 17th 2020

234-42.
23- Arnoni CP, Muniz JG, Paula TAd, Person RDdM, Gazito D, Baleotti Jr W, *et al*. An easy and efficient strategy for KEL genotyping in a multiethnic population. Revista brasileira de hematologia e hemoterapia 2013; 35(2): 99-102.
24- Lee S, Wu X, Reid M, Zelinski T, Redman C. Molecular basis of the Kell (K1) phenotype. Blood 1995; 85(4): 912-6.
25- Cruz Rde O, Mota MA, Conti FM, Pereira RA, Kutner JM, Aravechia MG, *et al*. Prevalence of erythrocyte alloimmunization in polytransfused patients. Einstein (São Paulo) 2011; 9(2): 173-8. [Article in English, Portuguese]
26- Hassan K, Younus M, Ikram N, Naseem L, Zaheer HA. Red cell alloimmunization in repeatedly transfused thalassemia major patients. Int J Pathol 2004; 2(1): 16-9.
27- Jain R, Choudhury N, Chudgar U, Harimoorthy V, Desai P, Perkins J, *et al*. Detection and identification of red cell alloantibodies in multiply transfused thalassemia major patients: A prospective study. Indian J Hematol Blood Transfus 2014; 30(4): 291-6.
28- Qidwai A, Mansoor N, Syeda A, Maheen H, Mohammad I, Malik F. Trends of red cell alloimmunization in β thalassemia major patients: A single center retrospective study in Karachi. J Blood Disord Treat 2018; 1(1): 3-5.
29- Karimi M, Nikrooz P, Kashef S, Jamalian N, Davatolhagh Z. RBC alloimmunization in blood transfusion-dependent β-thalassemia patients in southern Iran. Int J Lab Hematol 2007; 29(5): 321-6.
30- Azarkeivan A, Ansari S, Ahmadi MH, Hajibeigy B, Maghsudlu M, Nasizadeh S, *et al*. Blood transfusion and alloimmunization in patients with thalassemia: multicenter study. Pediatr Hematol Oncol 2011; 28(6): 479-85.
31- Davari K, Soltanpour MS. Study of alloimmunization and autoimmunization in Iranian β-thalassemia major patients. Asian J Transfus Sci 2016; 10(1): 88-92.
32- Sadeghian MH, Keramati MR, Badiei Z, Ravarian M, Ayatollahi H, Rafatpanah H, *et al*. Alloimmunization among transfusion-dependent thalassemia patients. Asian J Transfus Sci 2009; 3(2): 95-8.
33- Amin M, Gholamhossein T, Majid N, Marziyeh H, Narges S, Akbar D. Prevalence of alloimmunization against RBC antigens in thalassemia major patients in South East Of Iran. J Blood Disorders Transf 2013; 4(4): 1-4.
34- Azarkeivan A, Hadavand KM, Moghadam M, Shabehpour Z, Alizadeh S, Zareie M. Frequency of Kell antigen in donor blood bags used in adult thalassemia center. Sci J Iran Blood Transfus Organ. 2016; 12(4): 303-10. [Article in Farsi]
35- Osman NH. A comparison between using Peripheral Whole Blood and Buccal Swab For Red Cell Genotyping amongst Multiply-Transfused Thalassaemia patients [Thesis]. Malaysia: Universiti Sains Islam malaysia; 2016.

www.SID.ir

Archive of SID

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2019;16 (4): 259-269

Original Article

Study of Kell blood group genotype in alloimmiunized thalassemia patients

Sarihi R.[1], Amirizadeh N.[1], Oodi A.[1]

[1]Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Alloimmunization is the most serious problem in thalassemia patients and Anti-K is the most prevalent antibody in these patients. So accurate identification of this antigen can significantly decrease the rate of alloimmunization. Serological phenotyping is usually not reliable in multi-transfused patients. Molecular genotyping can overcome limitations of hemagglutination assays, resolve discrepant serologic typing and guide RBC selection for them. In this regard, we intended to determine the K and k among alloimmunized thalassemia patients using molecular methods and compare the results between different methods.

Materials and Methods

In this descriptive study, a total of 200 blood samples were collected randomly from alloimmunized thalassemia patients of Tehran Adult Thalassemia Clinic. The phenotype of all samples was determined for K and k. PCR-SSP was performed for all samples. The discrepant results between the phenotype and genotype were re-evaluated by PCR-RFLP and were confirmed by DNA sequencing.

Results

Sixty-three (28%) out of 200 patients developed Anti-K. Molecular typing of samples for K and k antigens revealed 96% (192 patients) KEL*02/KEL*02 and 4% (8 patients) KEL*01/KEL*02 among our samples. Discrepancy between the serology and genotyping results were detected in 8 cases that in all cases correction of genotype results was confirmed by DNA sequencing.

Conclusions

This study demonstrates that antibodies against K antigen continue to develop in thalassemia patients at high rate. Our findings suggest that RBC molecular genotyping is superior to serological phenotyping and is a good alternative and more reliable method especially in multi transfusion patients such as thalassemia patients.

Key words: Genotype, Kell Blood-Group System, Thalassemia

Received: 22 May 2019
Accepted: 18 Aug 2019

Correspondence: Oodi A., PhD of Hematology and Blood Banking. Assistant Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88601606; Fax: (+9821) 88601606
E-mail: *a.oodi@ibto.ir*

www.SID.ir

Downloaded from bloodjournal.ir at 11:31 +0330 on Monday February 17th 2020