Archive of SID

خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۷ شماره ۱ بهار ۹۹ (۴۶-۳۶)

مقاله پژوهشی

ژنوتیپ سیستم گروه خونی Rh در بیماران تالاسمی دارای آلوآنتی‌بادی درمانگاه تالاسمی بزرگسالان در سال‌های ۱۳۹۷-۱۳۹۶

راضیه دادخواه تهرانی[۱]، آرزو اودی[۲]، آزیتا آذرکیوان[۳]، ناصر امیری‌زاده[۴]

چکیده

سابقه و هدف

پس از سیستم ABO ، آنتی‌ژن‌های اصلی سیستم گروه خونی Rh (D، C، c، E، e)، ایمونوژن‌ترین آنتی‌ژن‌ها می‌باشند. روش سرولوژی با توجه به وجود گلبول‌های قرمز اهداکننده در گردش خون بیمار، قادر به تشخیص دقیق آنتی‌ژن‌های گروه‌های خونی در بیماران با تزریق خون مداوم نیست اما روش‌های مولکولی می‌توانند با بررسی DNA با صحت بالایی این آنتی‌ژن‌ها را تعیین کند.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه مقطعی ـ توصیفی، نمونه‌های خون محیطی ۲۰۰ بیمار مبتلا به 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) در درمانگاه تالاسمی تهران در سال‌های ۱۳۹۷-۱۳۹۶ جمع‌آوری گردید و تعیین فنوتیپ آنتی‌ژن‌های C ، c ، E ، e انجام شد. PCR-SSP برای تمامی نمونه‌ها انجام گرفت و در موارد ناهمخوانی بین نتایج ژنوتیپ و سرولوژی، نتایج به روش تعیین توالی DNA تایید شدند.

یافته‌ها

در این مطالعه بیشترین فراوانی آلوآنتی‌بادی‌ها در سیستم Rh مربوط به Anti-E (۴۴ بیمار، ۲۲٪) و Anti-D (۲۰ بیمار، ۱۰٪) و فراوانی آلل‌ها به روش ژنوتیپ به صورت ۱۴۲ نفر(۷۱٪) C، ۱۴۵ نفر(۷۲/۵٪) c ، ۴۶ نفر (۲۳٪) E و ۱۹۶ نفر(۹۸٪) e بوده است. در این مطالعه، ۳۸ مورد ناسازگاری بین نتایج سرولوژی و ژنوتیپ مشاهده شد. این ناسازگاری‌ها ۷/۵٪ (۱۴) در RHC ، ۶٪ (۱۱) در RHc ، ۹/۵٪ (۱۷) در RHE و ۱/۵٪ (۳) در RHe دیده شد.

نتیجه گیری

تعیین ژنوتیپ گروه‌های خونی می‌تواند به عنوان روش مکمل با رفع مشکلات روش سرولوژی، کمک شایانی به تعیین دقیق آنتی‌ژن‌های گروه خونی بکند.

کلمات کلیدی: تالاسمی، ژنوتیپ، گروه‌های خونی

تاریخ دریافت: ۹۸/۴/ ۹
تاریخ پذیرش: ۹۸/۷/۳۰

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
۳- فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی کودکان ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۴- مؤلف مسئول: PhD خون‌شناسی و بانک خون ـ دانشیار 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 12:19 +0430 on Tuesday May 5th 2020

Archive of SID

Downloaded from bloodjournal.ir at 12:19 +0430 on Tuesday May 5th 2020

مقدمه

از میان گروه‌های خونی که تاکنون شناخته شده، گروه‌های خونی Rh ، Kell ، Kidd و Duffy از جمله گروه‌های خونی هستند که از نظر بالینی مهم می‌باشند. سیستم Rh (ISBT 004) با پیچیده‌ترین اساس ژنتیکی و بیش از ۶۰ آنتی‌ژن، از نظر اهمیت بالینی بعد از ABO قرار می‌گیرد. پروتئین‌های Rh هر کدام از ۴۱۶ آمینو اسید ساخته شده و پروتئین‌های اصلی آن RhD و RhCE می‌باشد. سیستم Rh دارای آنتی‌ژن‌های فراوان و بسیار ایمونوژن است، اما قابل توجه‌ترین آنتی‌ژن آن ناشی از حضور و یا عدم حضور آنتی‌ژن D روی پلی‌پپتید RhD می‌باشد که معمولاً در انتقال خون برای بررسی سیستم Rh تنها حضور این آنتی‌ژن بر روی گلبول‌های قرمز بررسی می‌شود که به صورت Rh مثبت و Rh منفی گزارش می‌شود، اما آنتی‌ژن‌های دیگر Rh از جمله C, c, E, e نیز می‌تواند باعث واکنش‌های همولیتیک شدید در انتقال خون شوند که ایمونوژنسیتی آنتی‌ژن‌ها به صورت D> c>E>e>C می‌باشد(۳-۱).

دو جایگاه ژنی همولوگوس کد کننده دو پلی‌پپتید RhD (CD240D) و RhCE (CD240C) در کمپلکس رزوس در موقعیت کروموزومی۱ (P34-36.1) در کنار یگدیگر قرار می‌گیرند. محتوای ژنوم هر کدام از ژن‌های *RhD* و *RhCE* حدود ۷۵ Kbp می‌باشد و هرکدام دارای ۱۰ اگزون هستند. دو ژن *RhD* و *RhCE* در توالی نوکلئوتیدی، ۹۲٪ و در توالی آمینو اسیدی ۹۶٪ با یکدیگر هومولوژی دارند و دو قطعه دیگر به طول Kbp ۹ به نام Rhesus box با ۹۸/۶٪ شباهت در توالی و جهت‌گیری یکسان در دو طرف ژن *RhD* قرار گرفته است(۵-۲).

۴ آلل محصول ژن *RhCE* ناشی از پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی می‌باشند که ۴ تغییر نوکلئوتیدی باعث تغییر در توالی آمینواسیدی می‌شود. این جایگزینی‌ها در پلی‌مورفیسم C نسبت به c به ترتیب به صورت ۴۸nt C>G (اگزون ۱)، ۱۷۸nt A>C ، ۲۰۳nt G>A ، ۳۰۷nt T>C (هرسه در اگزون ۲) و در پلی‌مورفیسم E/e به صورت ۶۷۶nt C>G در اگزون ۵ می‌باشد(۶، ۲).

بیماری تالاسمی یکی از متداول‌ترین بیماری‌های ژنتیکی در سراسر جهان است و تزریق خون، مهم‌ترین درمان حمایتی برای این افراد می‌باشد. تزریق‌های مکرر خون، بیمار را در معرض عوارض فراوانی قرار می‌دهد که مهم‌ترین آن‌ها، آلوایمیونیزاسیون می‌باشد. طبق مطالعه‌های صورت گرفته، میزان آلوایمیونیزاسیون در بین جمعیت‌های متفاوت در بیماران تالاسمی حدود ۳۷٪-۵/۳٪ تخمین زده شده است(۸، ۷). تولید آنتی‌بادی می‌تواند به طور قابل توجهی در درمان اختلال ایجاد کرده و دسترسی به یک تزریق خون سازگار را با مشکل روبرو سازد(۱۰، ۹). اما فراهم آوردن یک تزریق خون سازگار در این بیماران، به دلیل طول عمر بیشتر گلبول‌های قرمز اهداکننده در بدن بیمار، باعث کاهش نیاز به تزریق خون و در نتیجه کاهش عوارض می‌شود (۱۱).

اگر چه روش سرولوژی(هماگلوتیناسیون) هنوز یک روش استاندارد برای تعیین فنوتیپ گروه‌های خونی می‌باشد اما انجام فنوتیپ در بیماران تالاسمی به دلیل حضور گلبول‌های قرمز اهداکننده در گردش خون بیمار و نیاز به تکرار بررسی‌ها به دلیل عدم شناسایی صحیح آنتی‌ژن‌ها، وقت‌گیر و تفسیر آن مشکل می‌باشد. روش‌های مولکولی مختلف با استفاده از آنالیز DNA می‌تواند به این محدودیت‌ها غلبه کند و امکان تعیین دقیق آلل‌های گروه‌های خونی و دست‌یابی به یک تزریق خون سازگار و سودمند را فراهم کند(۱۲، ۵). بدین جهت در مطالعه حاضر تلاش گردید برای اولین بار در ایران، روش‌های مولکولی شامل PCR-SSP و DNA Sequencing را برای تعیین آلل‌های C، c ، E، e از سیستم Rh راه‌اندازی کرده و نتایج آن را با روش سرولوژی در بیماران تالاسمی دارای تزریق خون متعدد مقایسه نماییم.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع مقطعی- توصیفی بود و از روش نمونه‌گیری غیر احتمالی آسان استفاده شد. برای بیان نتایج از روش‌های آماری توصیفی استفاده گردید.

در این مطالعه از ۲۰۰ بیمار مراجعه‌کننده به درمانگاه تالاسمی ظفر تهران با سابقه تولید آنتی‌بادی، ۵ میلی‌لیتر خون کامل EDTA دار جمع‌آوری گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from bloodjournal.ir at 12:19 +0430 on Tuesday May 5th 2020

تعداد ۱۰ اهداکننده سالم مراجعه‌کننده به سازمان انتقال خون به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. فنوتیپ و ژنوتیپ این بیماران تعیین شد و برای تایید نتایج، تعیین توالی انجام شد. از نمونه‌های کنترل جهت بهینه‌سازی راه‌اندازی روش‌های مولکولی و به عنوان نمونه کنترل مثبت استفاده شد.

تعیین فنوتیپ:

تعیین فنوتیپ آنتی‌ژن‌های e،E،c،C به صورت سرولوژیک با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال Anti-C، Anti-c ، Anti-E ، Anti-e (آلمان، GmbH ، ایمونودیا-نوستیکا) و با روش استاندارد لوله‌ای، بر اساس هماگلوتیناسیون استاندارد انجام پذیرفت. برای تعیین هر یک از آنتی‌ژن‌های گروه خونی، یک لوله اختصاص داده سپس به هر لوله یک قطره آنتی‌بادی و یک تا دو قطره از سوسپانسیون ۵٪-۳٪ گلبول قرمز اضافه گردید. سپس لوله-ها به مدت ۳۰ ثانیه با دور ۱۵۰۰rpm سانتریفیوژ شد. وجود آگلوتیناسیون در هر لوله در مقابل آینه مقعر همراه با حرکت دادن آهسته لوله‌ها بررسی 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.

روش‌های مولکولی:

استخراج DNA:

استخراج DNA از خون کامل یا بافی‌کوت، با استفاده از کیت Nucleic Acid purification محصول شرکت یکتا تجهیز آزما انجام گرفت. جهت اطمینان از کیفیت نمونه‌های استخراج شده، جذب نوری DNA استخراج شده توسط دستگاه نانو دراپ مورد بررسی قرار گرفت و نمونه‌ها در فریزر ۲۱- درجه سانتی گراد ذخیره شد.

مطالعه‌های بیوانفورماتیک:

از آن جایی که ژن *RHD* و ژن *RHCE* حدود ۹۶٪ در توالی نوکلئوتیدی با هم شباهت دارند، بنابراین آغازگرها باید به گونه‌ای طراحی می‌شدند که به طور اختصاصی به نواحی مورد نظر در هر یک از ژن‌ها متصل شوند تا از تکثیرهای نابه‌جای ژن‌ها در واکنش PCR ممانعت به عمل آید. برای بررسی این ژن از سه روش PCR-SSP و-PCR RFLP و DNA Sequencing استفاده گردید. از اگزون‌های ۱،۲ به دلیل وجود جایگزینی‌های تک نوکلئوتیدی بین دو آلل C و c و اینترون ۲ به دلیل اضافه شدن یک توالی bp ۱۰۹ در آلل C نسبت به c (و هم چنین آلل D) برای تمایز این دو پلی‌مورفیسم استفاده شد و هم چنین اگزون ۵ به دلیل وجود یک جایگزینی تک نوکلئوتیدی در جایگاه ۶۷۶ برای تعیین پلی‌مورفیسم E/e مورد استفاده قرار گرفت. جزئیات این تغییرات نوکلئوتیدی به تفصیل در مقدمه آورده شده است.

PCR-SSP:

آغازگرهای شروع‌کننده جهت PCR-SSP ، آلل‌های RhCE*C/c از مقاله اکمن و همکاران در سال ۲۰۰۲ و برای آلل‌های RHCE*E/e از مقاله فاس و همکاران در سال ۱۹۹۵ گرفته شد(جدول ۱)(۱۴، ۱۳). هورمون رشد انسانی به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید. حجم کلی واکنش ۲۵ µL و شامل: ۱۲/۵ µL از PCR 2x Master Mix (ایران، یکتا تجهیز آزما)، غلظت DNA ۵۰-۱۰۰ ng و غلظت مخلوط آغازگر مستقیم و معکوس برای هریک از آلل‌های C و E ۰/۴ µM و برای آلل‌های c و e ۰/۳ µM بوده است. ژنوتیپ تمامی بیماران با استفاده از روش PCR-SSP تعیین شد. برنامه دمایی در دستگاه ترموسایکلر برای این آلل‌ها به صورت زیر می‌باشد:

برای آلل RHCE*C/c : ۱ چرخه ۳ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۳ چرخه ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۶۳ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و ۱ چرخه ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد.

برای آلل RHCE*E/e : ۱ چرخه ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۵۲ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و ۱چرخه ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد.

پس از تکثیر DNA ، الکتروفورز محصولات حاصل از PCR روی ژل آگارز ۲٪ در دستگاه ژل داکت مشاهده

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from bloodjournal.ir at 12:19 +0430 on Tuesday May 5th 2020

جدول ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده جهت بررسی مولکولی به روش PCR-SSP (۱۴، ۱۳)

نام آغازگر	جلوبرنده/معکوس	توالی آغازگر	جایگاه تکثیر	اندازه محصول PCR
c (اگزون ۲)	جلوبرنده	5’-TGTGATGACCACCTTCCCTGG-3’	۱۴۹-۱۶۶nt	۱۷۹ bp
	معکوس	5’-TAGGCCAAGATCTGACCG-3’	۳۰۷–۳۲۷nt	
E (اگزون ۵)	جلوبرنده	5’-CCAAGTGTCAACTCTC-3’	۶۶۱–۶۷۶nt	۱۰۸ bp
	معکوس	5’-TGACCCTGAGATGGCTGT-3’	۷۵۱–۷۶۸nt	
e (اگزون ۵)	جلوبرنده	5’-CCAAGTGTCAACTCTG-3’	۶۶۱–۶۷۶nt	۱۴۱ bp
	معکوس	5’-CATGCTGATCTTCCT-3’	۷۸۷–۸۰۱nt	
C (اگزون ۱)	جلوبرنده	5’-GCGCTGCCTGCCCCTCTTC-3’	۲۹–۴۸nt	۱۱۴ bp
	معکوس	5’-TAGGATGCCACGAGCCCCTTT-3’	۱۲۳–۱۴۳nt	
C (اینترون ۲)	جلوبرنده	5’-TCAGGGGAGGGGCGTATCTTATTC-3’	۴۳۶۶–۴۳۸۹nt	C : ۵۹۴ bp
	معکوس	5’-GAACATGCCACTTCACTCCAG-3’	۴۹۳۸–۴۹۵۹nt	D or c: ۴۸۵ bp

گردید و نتایج ثبت و بررسی شد.

تعیین توالی DNA (DNA Sequencig):

در این روش جهت مشاهده SNPهای مورد نظر و تایید نتایج PCR-SSP و هم چنین امکان یافتن SNPهای جدید، از این روش استفاده گردید. در این روش از اگزون ۱ و اینترون۲ جهت شناسایی آلل‌های RHCE*C/c و از اگزون ۵ برای شناسایی آلل‌های RHCE*E/e استفاده شد و بیمارانی که بین فنوتیپ و ژنوتیپ آن‌ها تفاوت وجود داشت و هم چنین ۱۰ اهداکننده با فنوتیپ‌های متفاوت، جهت کنترل و Set up دو روش مذکور مورد استفاده قرار گرفتند. در ابتدا آغازگرهای مورد استفاده برای تعیین توالی این اگزون‌ها با الگو گرفتن از آغازگرهای معرفی شده توسط دوشر و همکارانش در سال ۲۰۰۵ که برای ژن *RHD* استفاده کردند، طراحی شدند و پس از تکثیر قطعات، تعیین توالی توسط برنامه کروماس تفسیر شد و SNPها تعیین گردید(۱۵).

حجم کلی واکنش برای اگزون ۱، ۵۰ µL و شامل: ۲۵ µL از Master Mix 2x PCR، غلظت DNA ۱۵۰ ng و غلظت آغازگر مستقیم و معکوس برای اگزون ۱، ۰/۶ µM بود. حجم کلی واکنش برای اگزون ۵، ۵۰ µL و شامل: ۲۵ µL از Master Mix 2x PCR، غلظت DNA ۵۰ ng و غلظت آغازگر مستقیم و معکوس برای اگزون ۱ µM ۰/۴ بود. برنامه دمایی برای هر دو واکنش PCR برای این اگزون‌ها در دستگاه ترموسایکلر به صورت زیر می‌باشد:
۱ چرخه ۲ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ چرخه ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۶۹ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و ۱چرخه ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد.

یافته‌ها

در این مطالعه ۲۰۰ بیمار تالاسمی دارای آلوآنتی‌بادی شامل ۸۱ (۴۰/۵٪) بیمار مذکر و ۱۱۹ (۵۹/۵٪) بیمار مؤنث و 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/بتا تالاسمی بودند.

نتایج تعیین نوع و فراوانی آلوآنتی‌بادی‌ها در جمعیت مورد مطالعه:

در مطالعه حاضر بیشترین فراوانی آلوآنتی‌بادی‌ها در گروه خونی Rh به صورت ۵۵ بیمار(۲۲٪) Anti-E و ۲۴ بیمار(۱۰٪) Anti-D بود. هم چنین آنتی‌بادی‌های دیگر گروه خونی Rh به صورت ۱۴ بیمار(۷٪) Anti-C ، ۱۰

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from bloodjournal.ir at 12:19 +0430 on Tuesday May 5th 2020

بیمار(۵٪) Anti-c و Anti-e حدود ۲ بیمار(۱٪) مشخص گردید(جدول ۲).

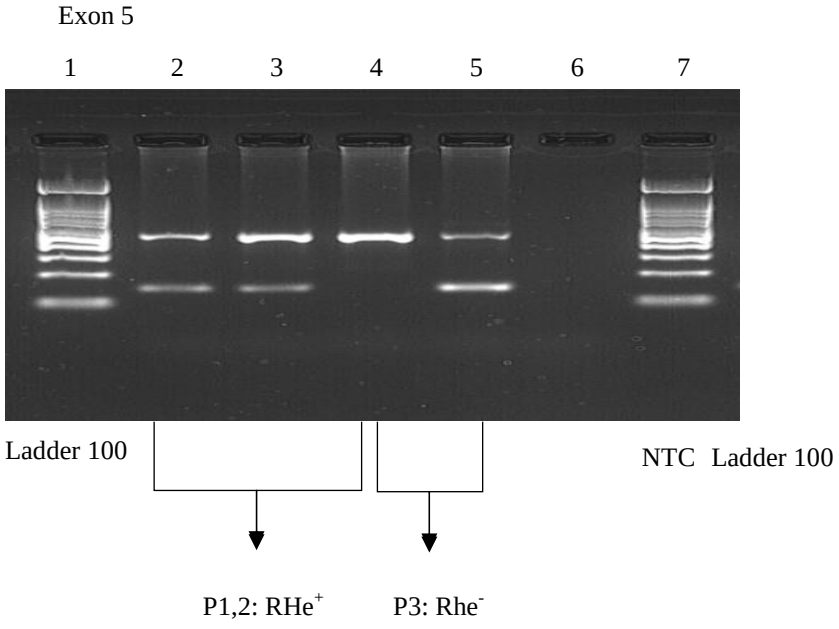
جمعیت مورد مطالعه به صورت ۱۳۹ (۶۹/۵٪) C ، ۱۴۶ (۷۳٪) c ، ۳۳ (۱۶/۵٪) E ، ۱۹۲ (۹۶٪) e مشاهده شد. هم چنین ۳۱ (۱۵/۵٪) بیمار دارای نتایج Field Mixed بودند.

نتایج تعیین فنوتیپ برای آنتی‌ژن‌های C/c و E/e:

فراوانی هر یک از این آلل‌ها با روش سرولوژی در

جدول ۲: فراوانی آلوآنتی‌بادی‌ها در گروه خونی Rh

انواع آلوآنتی‌بادی	تعداد بیماران دارای آنتی‌بادی	درصد بیماران	انواع آلوآنتی‌بادی	تعداد بیماران دارای آنتی‌بادی	درصد بیماران
Anti-S	۸	٪۳	Anti-K	۶۲	٪۲۷
Anti-Cw	۵	٪۲	Anti-Kpa	۱۴	٪۷
Anti-s	۲	٪۱	Non Specific Clinical Antibodies	۱۴	٪۷
Anti-Fyb	۲	٪۱	Anti-Jka	۱۲	٪۴
			Anti-Jkb	۸	٪۳

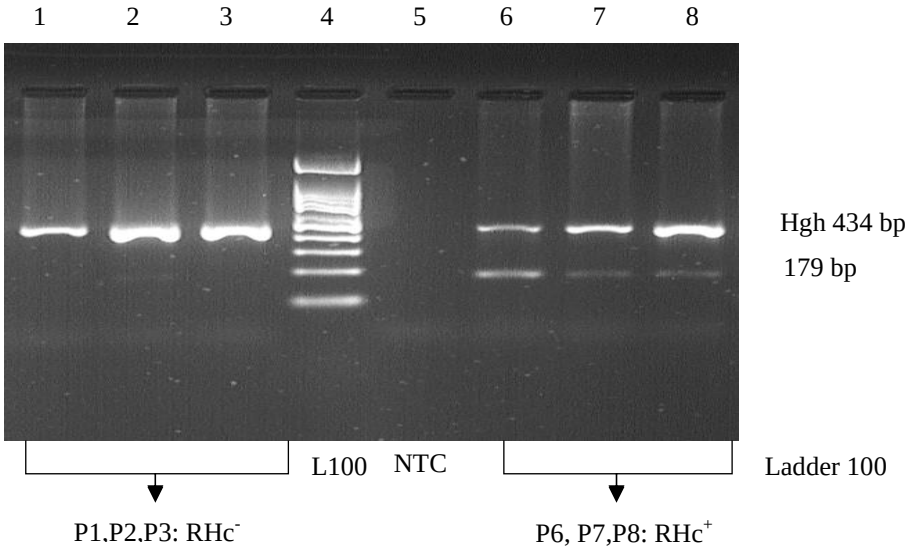


شکل ۱: الکتروفورز محصولات تکثیر اگزون ۵ ژن *RHCE* به روش PCR- SSP (آلل RHe) در ژل آگارز ۲٪ . نمونه بیماران در ستون ۲ و ۳ مثبت(علاوه بر باند هورمون رشد باند اختصاصی مربوط به آلل RHe به طول bp ۱۴۱ تشکیل شده است) و نمونه بیمار در ستون شماره ۴ منفی می‌باشند(تنها باند هورمون رشد دیده می‌شود). ستون ۶: کنترل منفی آغازگرها.

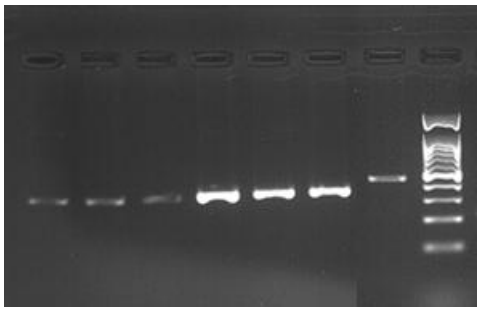
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from bloodjournal.ir at 12:19 +0430 on Tuesday May 5th 2020



شکل ۲: الکتروفورز محصولات PCR-SSP مربوط به اگزون ۲ آلل RHc برروی ژل آگارز ۲٪ . نمونه بیماران در ستون‌های ۲، ۱ و ۳ منفی (تنها باند هورمون رشد دیده می‌شود) و نمونه بیماران در ستون‌های ۶، ۷ و ۸ مثبت(علاوه بر باند مربوط به هورمون رشد باند اختصاصی RHc به طول bp ۱۷۹مشاهده می‌شود) می‌باشند، ردیف ۵: کنترل منفی آغازگر



شکل ۳: الکتروفورز محصولات به دست آمده از تکثیر اگزون‌های۱ و ۵ ژن *RHCE* روی ژل آگارز ۲٪ . ردیف ۱-۳: اگزون ۱، ردیف ۴-۶: اگزون ۵

نتایج مربوط به آزمایش مولکولی PCR-SSP :

درصد فراوانی ژنوتیپ آلل‌های گروه خونی Rh بیماران در این مطالعه به صورت ۱۴۲ نفر(۷۱٪) C ، ۱۴۵ نفر (۷۲/۵٪) c، ۴۶ نفر(۲۳٪)E و ۱۹۶ نفر(۹۸٪) e، بود (شکل‌های ۱ و ۲).

نتایج مربوط به تعیین توالی اگزون ۱ و ۵ از لکوس ژنی RHCE :

در این مطالعه بین نتایج تعیین توالی و PCR-SSP هیچ گونه تناقضی دیده نشد و تعیین توالی نتایج PCR-SSP را کاملاً تایید کرد.

طول قطعه تکثیر شده از اگزون ۱، bp ۳۴۰ و اگزون ۵، bp ۳۶۷ می‌باشد. این قطعات تکثیر شده روی ژل آگارز ۲ درصد قابل مشاهده هستند(شکل ۳).

سپس نتایج حاصل از تعیین توالی با استفاده از نرم‌افزار (کروماس) مورد بررسی قرار گرفت(شکل‌های ۴ و ۵).

در این نمونه در نوکلئوتید ۴۸ بازهای C و G وجود دارند که سبب می‌شود ژنوتیپ این نمونه به صورت

www.SID.ir

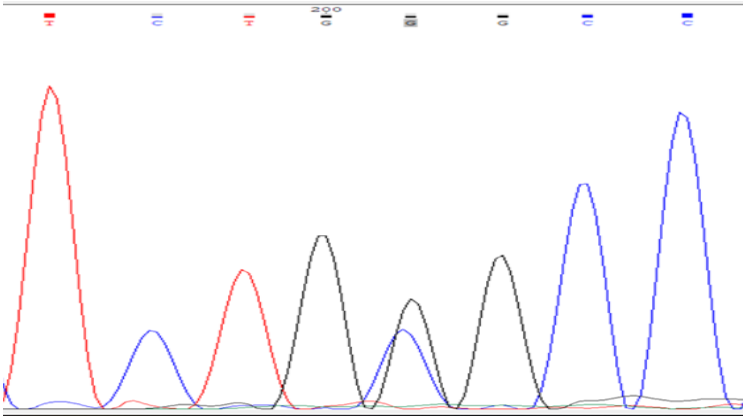
Archive of SID

Downloaded from bloodjournal.ir at 12:19 +0430 on Tuesday May 5th 2020

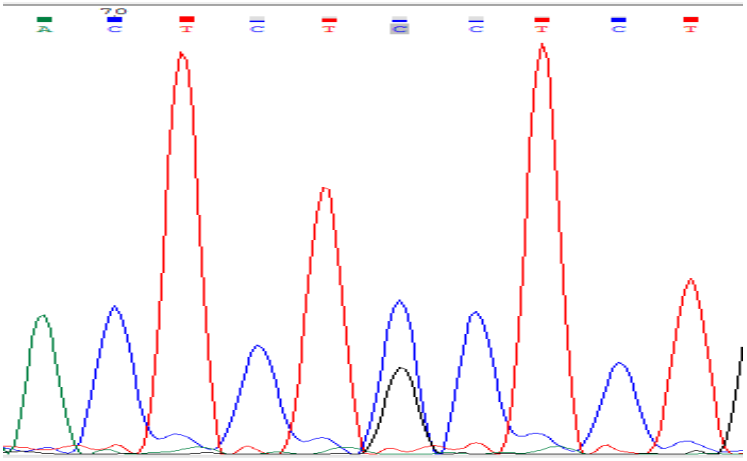
هتروزیگوت RHCE*C/c باشد.

نتایج حاصل از مقایسه آزمایش‌های سرولوژی و روش مولکولی:

در این مطالعه با مقایسه نتایج سرولوژی و ژنوتیپ، از بین ۲۰۰ بیمار مورد بررسی، ۴۸ بیمار در آلل‌های مختلف گروه خونی Rh دارای تناقض بوده اند. این اختلافات به صورت RhC ٪۷/۵ (۱۴) ، Rhc ٪۶ (۱۱)، RhE ٪۹/۵ (۱۷)، Rhe ٪۳/۵ (۳) دیده شد.



شکل ۴: کروماتوگراف حاصل از تعیین توالی اگزون ۱ ژن *RHCE* با استفاده از نرم‌افزار Chromas. در این نمونه در نوکلئوتید ۴۸ بازهای C و G وجود دارند که سبب می‌شود ژنوتیپ این نمونه به صورت هتروزیگوت RHCE*C/c شود.



شکل ۵: کروماتوگراف حاصل از تعیین توالی اگزون ۵ ژن *RHCE* با استفاده از نرم‌افزار Chromas . در این نمونه در نوکلئوتید ۶۷۶ ، باز C و G وجود دارد که سبب می‌شود ژنوتیپ این نمونه به صورت هتروزیگوت RHCE*E/e باشد.

بحث

تزریق خون مداوم، یک درمان حمایتی و مهم در بیماران تالاسمی می‌باشد. یکی از مهم‌ترین عوارض تزریق خون، آلوایمیونیزاسیون است که به طور قابل توجهی دسترسی به یک تزریق خون ایمن را با مشکل روبرو می‌سازد و باعث واکنش‌های همولیتیک حاد و تاخیری در بیماران می‌شود که مهم‌ترین این آلوآنتی‌بادی‌ها مربوط به گروه خونی Rh می‌باشد(۹). در مطالعه حاضر، بیشترین فراوانی آلوآنتی‌بادی در گروه خونی Rh از نوع (٪۲۲) Anti-E و (٪۱۰) Anti-D بود، هم چنین آنتی‌بادی‌های

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from bloodjournal.ir at 12:19 +0430 on Tuesday May 5th 2020

دیگر گروه خونی Rh به صورت(۷٪) Anti-C ، (۵٪) Anti-c و Anti-e حدود ۱٪ مشخص گردید. کریمی و همکاران در مطالعه خود در سال ۲۰۰۷ میزان آلوایمیونیزاسیون را در جنوب ایران ۵/۳٪ گزارش کردند که بیشترین فراوانی آلوآنتی‌بادی‌ها در گروه خونی Rh مربوط به (۱۵٪)Anti-D و (۱۰٪) Anti-E بود(۱۶). صادقیان و همکاران در مطالعه خود در سال ۲۰۰۹، میزان آلوایمیونیزاسیون در شمال شرق ایران را ۲/۸۷٪ گزارش کردند که بیشترین فراوانی آلوآنتی بادی مربوط به(۸۸٪) Anti-D و سپس Anti-C و Anti-E بوده است(۱۷). در مطالعه‌ای که آذرکیوان و همکارانش در سال ۲۰۱۱ در ۸۳۵ بیمار تالاسمی انجام دادند، Anti-K (۳۴٪) بیشترین آلوآنتی‌بادی و پس از آن (۱۱٪) Anti-D و (۱۰٪) Anti-E دارای بیشترین فراوانی بودند. هم چنین در این مطالعه درصد فراوانی سایر آلوآنتی‌بادی‌های مربوط به گروه خونی Rh ، ۱۵٪ گزارش گردید(۱۸). در مطالعه مروری که در سال ۲۰۱۶ توسط پورفتح‌اله و همکارانش انجام شد، میزان آلوایمیونیزاسیون در ایران ۱۰٪ گزارش شد که در این مطالعه بیشترین آلوآنتی‌بادی‌ها مربوط به Anti-K (۳۷٪)، Anti-D (۲۹٪) و Anti-E (۲۰٪) بودند (۱۹). همان طور که مشاهده می‌شود، فراوانی آلوآنتی‌بادی‌ها در این مطالعه به مطالعه‌های انجام شده در داخل کشور شباهت زیادی دارد.

در مطالعه حاضر با مقایسه نتایج سرولوژی و ژنوتیپ، بیماران در ۴۵ آلل(۲۲/۵٪) مربوط به گروه خونی Rh دارای تناقض بوده‌اند. این تناقضات ۷/۵٪ در آلل C، ۶٪ در آلل c، ۹/۵٪ در آلل E و ۱/۶٪ در آلل e بوده است. هم چنین در این مطالعه ۳۱ (۱۵/۵٪) بیمار نیز در آزمایش سرولوژی دارای واکنش میکسد فیلد بوده‌اند که درصد قابل توجهی می‌باشد. در چندین مطالعه مشابه، بین نتایج سرولوژی و ژنوتیپ، اختلافاتی دیده شد که در بیشتر این مطالعه‌ها بیشترین اختلافات مربوط به سیستم Rh بود.

در سال ۲۰۰۹ مطالعه‌ای توسط شایگان و همکارانش روی ۴۴ بیمار با تزریق خون مداوم جهت تعیین آلل‌های گروه‌های خونی فرعی Rh، Kell، Kidd ، Duffy به دو روش هماگلوتیناسیون و تعیین ژنوتیپ به روش RFLP PCR در ایران صورت گرفت. در این مطالعه در ۲۶ نفر از بیماران، ۵۳ مورد ناسازگاری در آلل‌های مختلف مشاهده شد که بیشترین ناسازگاری مربوط به گروه خونی Rh (۱۹مورد) بود(۲۰).

در سال ۲۰۱۰ در مطالعه‌ای که توسط گوئلسین و همکارانش در جنوب برزیل انجام شد، ۱۰٪ بیماران دارای آلوآنتی‌بادی بودند و بین دو روش فنوتیپ و ژنوتیپ، ۱۶ اختلاف مشخص شد. در این مطالعه بیشترین تناقض در گروه خونی Rh یافت گردید که ازبین ۱۶ تناقض دیده شده در ۳۸ بیمار، ۸ تناقض در ۵ آلل اصلی D، C، c، E، e این گروه خونی دیده شد(۲۱٪)(۲۱).

آنجلابلسیتو و همکارانش در سال ۲۰۱۵، در مطالعه‌ای جهت بررسی و مقایسه این دو روش، در ۴۶٪ عدم تطابق برای گروه RhCE (بیشترین تناقض) مشاهده کردند (۲۲).

ژان و همکارانش در سال ۲۰۱۶، در بیماران با تزریق خون مکرر مطالعه‌ای را به انجام رسانیدند. تعیین فنوتیپ گروه‌های خونی Rh ، Kell ، Kidd ، Duffy و MNSs را به دوروش سرولوژی و ژنوتیپ انجام دادند. از بین ۳ نفر تالاسمی، یک نفر دارای دو اختلاف در گروه RhCE بود که در روش سرولوژی به صورت RH*CE C/c و E/e RH*CE و در ژنوتیپ به صورت RH*CE C/C و RH*CE e/e مشخص گردید. در این مطالعه در افراد بدون تزریق خون قبلی، بین نتایج فنوتیپ و ژنوتیپ هیچ گونه تناقضی مشاهده نگردید. نتایج این مطالعه نیز حمایت کننده نتایج ما در راستای وجود اختلال در تعیین فنوتیپ افراد با تزریق خون مداوم می‌باشد(۲۳).

سپس در سال ۲۰۱۷ مطابق مطالعه صورت گرفته توسط روسانا پاتزولا و همکارانش، در صورت تزریق خون مطابق با گروه خون مشخص شده به روش مولکولی، هیچ گونه افزایشی در تولید آلوآنتی‌بادی آن‌ها مشاهده نگردید. این مطالعه اهمیت تعیین دقیق گروه‌های خونی مهم و تزریق واحدهای کاملاً سازگار در افراد گیرنده‌ی خون را بیان می‌کند(۹). در این مطالعه از ۱۰ اهداکننده مستمر، به عنوان نمونه کنترل استفاده شد. فنوتیپ وژنوتیپ این نمونه‌ها به ترتیب با استفاده از روش استاندارد سرولوژی و روش‌های

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from bloodjournal.ir at 12:19 +0430 on Tuesday May 5th 2020

مولکولی تعیین شد. نتایج این روش‌ها کاملاً با یکدیگر تطابق داشته و می‌توان گفت حساسیت و اختصاصیت روش مولکولی نسبت به روش استاندارد هماگلوتیناسیون ۱۰۰٪ بوده است. اما در این مطالعه به دلیل این که بیماران تالاسمی مد نظر هستند و این بیماران به طور مکرر خون دریافت می‌کنند، در تعیین صحیح فنوتیپ این بیماران با مشکل روبرو هستیم. همان طور که گفته شد، در این مطالعه ۴۵ مورد ناسازگاری بین فنوتیپ و ژنوتیپ در آلل‌های مختلف گروه خونی Rh دیده شد. بنابراین برای این بیماران نمی‌توان از روش سرولوژی به عنوان روش استاندارد استفاده کرد. اگر در بین روش‌های مولکولی، روش تعیین توالی را به عنوان روش استاندارد در نظر بگیریم، خواهیم دید حساسیت و اختصاصیت سایر روش‌های مولکولی، نسبت به این روش ۱۰۰٪ بوده است. نتایج متفاوت بین روش سرولوژی و روش‌های مولکولی در این مطالعه و سایر مطالعه‌های انجام شده در این راستا، نشان می‌دهد که اگر چه روش سرولوژی به عنوان روش استاندارد برای تعیین فنوتیپ گروه‌های خونی استفاده می‌شود اما محدودیت‌های این روش در بعضی مواقع به خصوص در بیماران با تزریق خون مکرر، سبب تولید و گسترش آلوآنتی‌بادی در این افراد می‌شود. در مطالعه حاضر برای تعیین ژنوتیپ گروه خونی Rh ، از روش‌های مولکولی مختلفی استفاده گردید که همان طور که ذکر شد، نتایج این روش‌ها یکدیگر را تایید کردند. در نتیجه نتایج این مطالعه و سایر مطالعه‌ها نشان‌دهنده اختصاصیت بالای روش‌های مولکولی و امکان استفاده از آن‌ها به عنوان روش مکمل در تعیین گروه‌های خونی می‌باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این مطالعه و سایر مطالعه‌های انجام شده، آنتی‌بادی‌های مربوط به گروه خونی Rh در بیماران تالاسمی با فراوانی بالایی تولید می‌شوند، تعیین دقیق آنتی‌ژن‌های این سیستم خونی قبل و حتی بعد از تزریق خون می‌تواند باعث کاهش قابل توجه آلوایمیونیزاسیون در تزریق‌های بعدی خون در این بیماران شود. بنا بر نتایج این مطالعه، روش‌های مولکولی با حل مشکلات روش سرولوژی به عنوان یک روش مکمل، می‌توانند به تعیین دقیق این آنتی‌ژن‌ها کمک کنند.

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 سازمان تامین گردیده است.

References:

1- Fung M, Grossman B, Hillyer C, Westhoff C. Technical Manual. 18th ed. USA: AABB; 2014. p. 297-300.
2- Daniels G, Sanger R. Human blood groups. Philadelphia: Wiley Online Library; 2002. p. 182-93.
3- McPherson RA, Pincus MR. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 2017. p. 690-5.
4- Wagner FF, Flegel WA. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. Blood 2000; 95(12): 3662-8.
5- Fasano RM. Hemolytic disease of the fetus and newborn in the molecular era. Semin Fetal Neonatal Med 2016; 21(1): 28-34.
6- Lasić L, Lojo-Kadrić N, Silajdžić E, Pojskić L, Hadžiselimović R, Pojskić N. Molecular-genetic variance of RH blood group system within human population of Bosnia and Herzegovina. Bosn J Basic Med Sci 2013; 13(1): 10-3.
7- Beiboer SH, Wieringa-Jelsma T, Maaskant-Van Wijk PA, Van Der Schoot CE, Van Zwieten R, Roos D, *et al*. Rapid genotyping of blood group antigens by multiplex polymerase chain reaction and DNA microarray hybridization. Transfusion 2005; 45(5): 667-79.
8- Vichinsky E, Neumayr L, Trimble S, Giardina PJ, Cohen AR, Coates T, *et al*. Transfusion complications in thalassemia patients: a report from the C enters for D isease C ontrol and P revention (CME). Transfusion 2014; 54(4): 972-81.
9- Putzulu R, Piccirillo N, Orlando N, Massini G, Maresca M, Scavone F, *et al*. The role of molecular typing and perfect match transfusion in sickle cell

www.SID.ir

Archive of SID

disease and thalassaemia: an innovative transfusion strategy. Transfus Apher Sci 2017; 56(2): 234-7.
10- Belsito A, Magnussen K, Napoli C. Emerging strategies of blood group genotyping for patients with hemoglobinopathies. Transfus Apher Sci 2017; 56(2): 206-13.
11- Osman NH, Sathar J, Leong CF, Zulkifli NF, Sabudin RZAR, Othman A, *et al*. Importance of extended blood group genotyping in multiply transfused patients. Transfus Apher Sci 2017; 56(3): 410-6.
12- Castilho L, Rios M, Pellegrino Jr J, TO Saad S, F. Costa F. Blood group genotyping facilitates transfusion of β-thalassemia patients. J Clin Lab Anal 2002; 16(5): 216-20.
13- Ekman G, Billingsly R, Hessner M. Rh genotyping: Avoiding false-negative and false-positive results among individuals of African ancestry. Am J Hematol 2002; 69(1): 34-40.
14- Faas B, Simsek S, Bleeker P, Overbeeke M, Cuijpers H, von dem Borne A, *et al*. Rh E/e genotyping by allele-specific primer amplification. Blood 1995; 85(3): 829-32.
15- Doescher A, Flegel WA, Petershofen EK, Bauerfeind U, Wagner FF. Weak D type 1.1 exemplifies another complexity in weak D genotyping. Transfusion 2005; 45(10): 1568-73.
16- 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.
17- 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.
18- 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.
19- Darvishi P, Azami M, Sayehmiri K, Sayehmiri F, Goodarzi A, Azarkeivan A, *et al*. Red blood cell alloimmunization in Iranian beta-thalassemia patients: a systematic review and meta-analysis. ISBT Science Series 2016; 11(3): 163-73.
20- Shaiegan M, Samiee S, Azarkeivan A, Daneils J, Martin P, Ataiee Z, *et al*. Molecular blood genotyping in patients with Thalassemia major in Tehran Adult Thalassemic Clinic. Sci J Iran Blood Transfus Organ 2009; 6(2): 107-15. [Article in Farsi]
21- 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.
22- Belsito A, Costa D, Fiorito C, De Iorio G, Casamassimi A, Perrotta S, *et al*. Erythrocyte genotyping for transfusion-dependent patients at the Azienda Universitaria Policlinico of Naples. Transfus Apher Sci 2015; 52(1): 72-7.
23- 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. J Biosci Med 2016; 4(3): 1.

Downloaded from bloodjournal.ir at 12:19 +0430 on Tuesday May 5th 2020

www.SID.ir

Archive of SID

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2020;17(1): 36-46

Original Article

Rh blood group genotyping in alloimmunized thalassemic patients in Tehran Adult Thalassemia Clinic during 2017-18

Dadkhah Tehrani R.[1], Oodi A.[1], Azarkeivan A.[1], Amirizadeh N.[1]

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

Abstract

Background and Objectives

The main antigens of the Rh blood group system (D,C,c,E,e) after the ABO system, are the most immune antigens. Due to existence of donor's red blood cells in the patient's circulation serologic methods can not accurately detect blood group antigens in patients with chronic blood transfusions, but molecular methods can overcome many of these limitations.

Materials and Methods

In this cross sectional descriptive study, peripheral blood samples were taken from two hundred of alloimmunized thalassemic patients including 81 (40.5%) male and 119 (59.5%) female with mean age of 30 ± 10.9 (age range 4-65) at Tehran Thalassemia Clinic during 1976-96. Phenotyping was done for C,c,E,e antigens. Sequence Specific Primers (SSPs)-PCR was performed and the discrepant results between the phenotype and genotyping were confirmed by DNA sequencing.

Results

In this study, the highest prevalence of alloantibodies in the Rh system pertained to Anti-E 22% (44 patients) and Anti-D 10% (20 patients) and the frequency of the alleles in this blood group was determined C 71% (142), c 72.5% (145), E 23% (46), e 98% (196). Thirty eight out of 200 patients had different results between serology and genotype. Discrepancies were 7.5% (14) (RHC), 6% (11) (RHc), 9.5% (17) (RHE), and 1.5% (3) (RHe).

Conclusions

Molecular methods can help to determine the exact antigens as a complementary method by solving the problems of the serological method.

Key words: Thalassemia, Genotype , Blood Groups

Received: 30 Jun 2019
Accepted: 22 Oct 2019

Correspondence: Amirizadeh N., PhD of Hematology and Blood Banking. Associate Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88601599; Fax: (+9821) 88601599
E-mail: *n.amirizadeh@ibto.ir*

www.SID.ir

Downloaded from bloodjournal.ir at 12:19 +0430 on Tuesday May 5th 2020