

ژنوتیپ سیستم گروه خونی Rh در بیماران تالاسمی دارای آلوآنتی بادی در مانگاه تالاسمی بزرگسالان در سال‌های ۱۳۹۶-۱۳۹۷

راضیه دادخواه تهرانی^۱، آرزو اودی^۲، آرزیتا آذرکیوان^۳، ناصر امیری زاده^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 کنند.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه مقطعی - 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 $30 \pm 10/9$ سال (رنج سنی ۴-۶۵ سال) در درمانگاه تالاسمی تهران در سال‌های ۱۳۹۶-۱۳۹۷ 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.

نتیجه‌گیری

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 - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۲- PhD خون‌شناسی و بانک خون - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۳- فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی کودکان - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۴- مؤلف مسئول: PhD خون‌شناسی و بانک خون - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

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 ایمنونژن 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 ایمنونژنسیتی آنتی‌ژن‌ها به صورت $D > c > E > e > C$ می‌باشد (۱-۳).

دو جایگاه ژنی همولوگوس کد کننده دو پلی‌پپتید RhD (CD240D) و RhCE (CD240C) در کمپلکس رزوس در موقعیت کروموزومی ۱ (P34-36.1) در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند. محتوای ژنوم هر کدام از ژن‌های RhD و RhCE حدود ۷۵ Kbp می‌باشد و هر کدام دارای ۱۰ اگزون هستند. دو ژن RhD و RhCE در توالی نوکلئوتیدی، ۹۲٪ و در توالی آمینو اسیدی ۹۶٪ با یکدیگر همولوژی دارند و دو قطعه دیگر به طول ۹ Kbp به نام Rhesus box با ۹۸/۶٪ شباهت در توالی و جهت‌گیری یکسان در دو طرف ژن RhD قرار گرفته است (۴-۵).

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 $48\text{nt } C > G$ (اگزون ۱)، $17\text{nt } A > C$ ، $203\text{nt } G > A$ ، $307\text{nt } T > C$ (هرسه در اگزون ۲) و در پلی‌مورفیسم E/e به صورت $676\text{nt } C > G$ در اگزون ۵ می‌باشد (۶، ۷).

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 (۹، ۱۰). 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.

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-e, Anti-E, Anti-c (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 لوله‌ها به مدت ۳۰ ثانیه با دور ۱۵۰۰ rpm سانتیفریوژ 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 بیوفلورسانس:

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 ناهنجاری ژن‌ها در واکنش PCR ممانعت به عمل آید. برای بررسی این ژن از سه روش PCR-SSP و RFLP و DNA Sequencing استفاده گردید. از اگزون‌های ۱، ۲ به دلیل وجود جایگزینی‌های تک نوکلئوتیدی بین دو آلل C و c و ایترون ۲ به دلیل اضافه شدن یک توالی ۱۰۹ bp 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 ۵۰-۱۰۰ ng DNA 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 ۱ چرخه ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد.
پس از تکثیر DNA، الکتروفورز محصولات حاصل از PCR روی ژل آگارز ۲٪ در دستگاه ژل داکت مشاهده

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 معکوس	5'-TGTGATGACCACCTTCCCTGG-3' 5'-TAGGCCAAGATCTGACCG-3'	۱۴۹-۱۶۶nt ۳۰۷-۳۲۷nt	۱۷۹ bp
E (اگزون ۵)	جلوبرنده معکوس	5'-CCAAGTGTCAACTCTC-3' 5'-TGACCCTGAGATGGCTGT-3'	۶۶۱-۶۷۶nt ۷۵۱-۷۶۸nt	۱۰۸ bp
e (اگزون ۵)	جلوبرنده معکوس	5'-CCAAGTGTCAACTCTG-3' 5'-CATGCTGATCTTCCT-3'	۶۶۱-۶۷۶nt ۷۸۷-۸۰۱nt	۱۴۱ bp
C (اگزون ۱)	جلوبرنده معکوس	5'-GCGCTGCCTGCCCCCTCTTC-3' 5'-TAGGATGCCACGAGCCCCCTTT-3'	۲۹-۴۸nt ۱۲۳-۱۴۳nt	۱۱۴ bp
C (اینترون ۲)	جلوبرنده معکوس	5'-TCAGGGGAGGGGCGTATCTTATTC-3' 5'-GAACATGCCACTTCACTCCAG-3'	۴۳۶۶-۴۳۸۹nt ۴۹۳۸-۴۹۵۹nt	C : ۵۹۴ bp D or c: ۴۸۵ bp

گردید و نتایج ثبت و بررسی شد.

تعیین توالی DNA (DNA Sequencing):

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 اینترون ۲ 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 از Master Mix 2x PCR، غلظت ۱۵۰ ng DNA و غلظت آغازگر مستقیم و معکوس برای اگزون ۱، ۰/۶ μM بود. حجم کلی واکنش برای اگزون ۵، ۵۰ μL و شامل: ۲۵ از Master Mix 2x PCR، غلظت ۵۰ ng DNA و

غلظت آغازگر مستقیم و معکوس برای اگزون ۱ ۰/۴ μM 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 ۱ چرخه ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد.

یافته‌ها

در این مطالعه ۲۰۰ بیمار تالاسمی دارای آلواتنی‌بادی 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 اینترمیدیا و ۲ (۱٪) بیمار مبتلا به سیکل/بتا تالاسمی بودند.

نتایج تعیین نوع و فراوانی آلواتنی‌بادی‌ها در جمعیت مورد مطالعه:

در مطالعه حاضر بیشترین فراوانی آلواتنی‌بادی‌ها 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

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

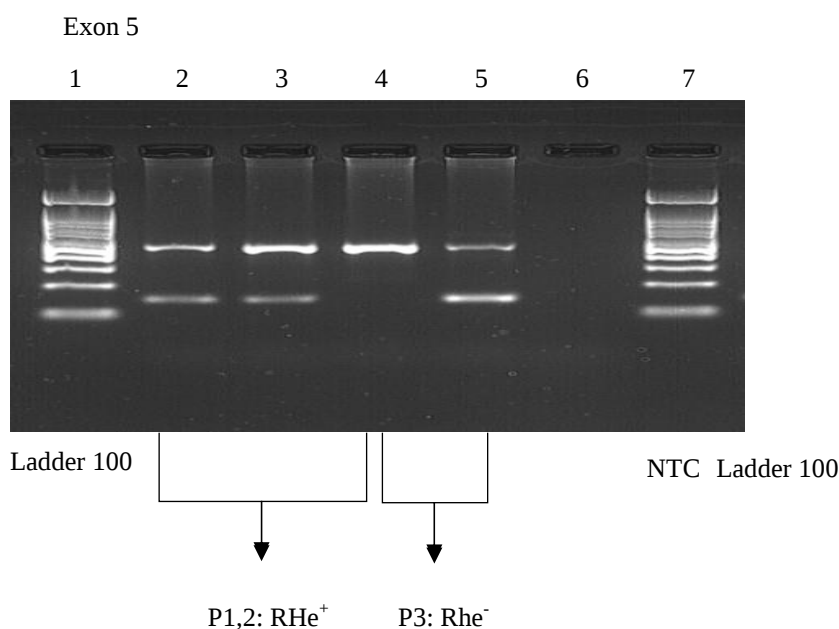
چنین ۳۱ (۱۵/۵٪) بیمار دارای نتایج Field Mixed بودند.

نتایج تعیین فنوتیپ برای آنتی ژن های C/c و E/e:

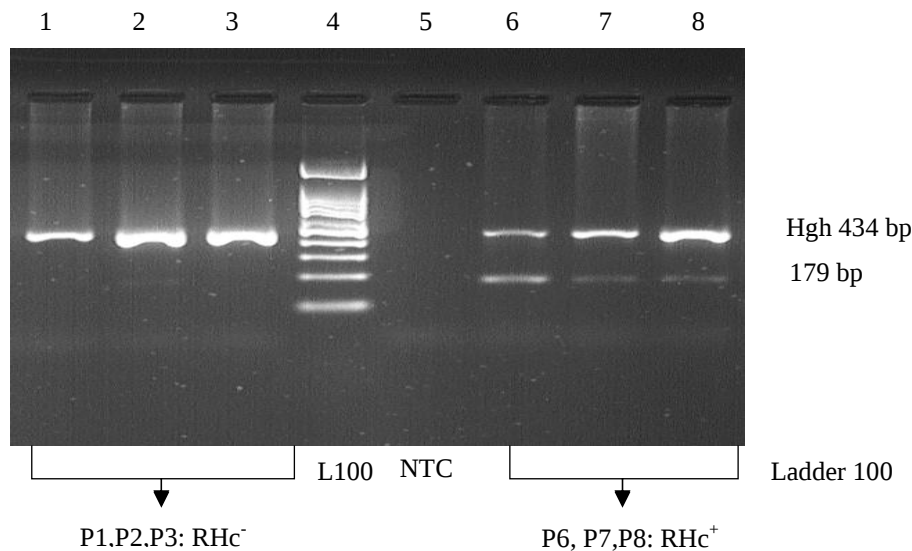
فراوانی هر یک از این آلل ها با روش سرولوژی در

جدول ۲: فراوانی آلوانتی بادی ها در گروه خونی Rh

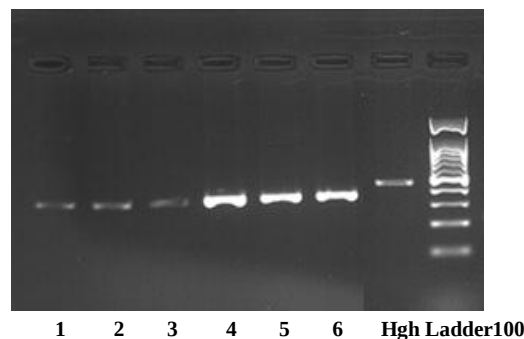
انواع آلوانتی بادی	تعداد بیماران دارای آنتی بادی	درصد بیماران	انواع آلوانتی بادی	تعداد بیماران دارای آنتی بادی	درصد بیماران
Anti-S	۸	۳٪	Anti-K	۶۲	۲۷٪
Anti-Cw	۵	۲٪	Anti-Kpa	۱۴	۷٪
Anti-s	۲	۱٪	Non Specific Clinical Antibodies	۱۴	۷٪
Anti-Fyb	۲	۱٪	Anti-Jka	۱۲	۴٪
			Anti-Jkb	۸	۳٪



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 ۱۴۱ bp تشکیل شده است) و نمونه بیمار در ستون شماره ۴ منفی می باشند (تنها باند هورمون رشد دیده می شود). ستون ۶: کنترل منفی آغازگرها.



شکل ۲: الکتروفورز محصولات PCR-SSP مربوط به اگزون ۲ آلل RHc بر روی ژل آگارز ۲٪. نمونه بیماران در ستون‌های ۱، ۲ 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 ۱۷۹ bp مشاهده می‌شود) می‌باشند، ردیف ۵: کنترل منفی آغازگر



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

گونه تناقضی دیده نشد و تعیین توالی نتایج PCR-SSP را کاملاً تایید کرد.

طول قطعه تکثیر شده از اگزون ۱، ۳۴۰ bp و اگزون ۵، ۳۶۷ bp 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

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).

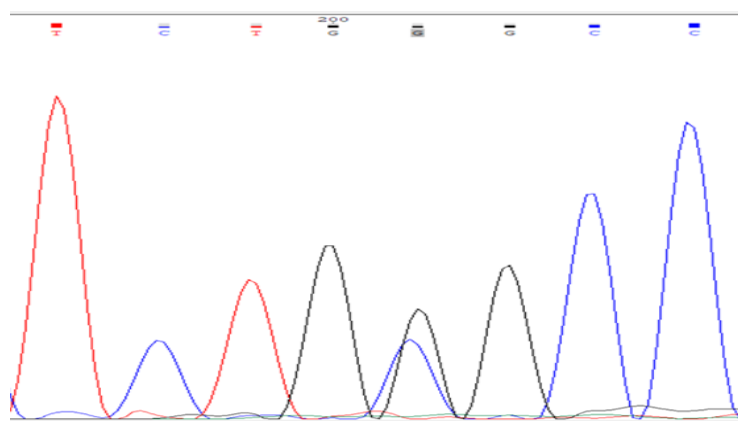
نتایج مربوط به تعیین توالی اگزون ۱ و ۵ از لکوس ژنی RHCE :

در این مطالعه بین نتایج تعیین توالی و PCR-SSP هیچ

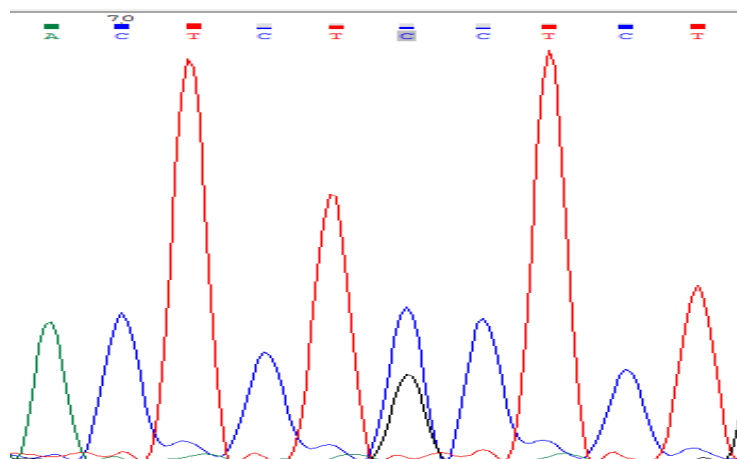
بین ۲۰۰ بیمار مورد بررسی، ۴۸ بیمار در آل‌های مختلف گروه خونی Rh دارای تناقض بوده‌اند. این اختلافات به صورت ۷/۵٪ RhC ، ۶٪ (۱۱) RhE ، ۹/۵٪ (۱۷) RhE ، ۳/۵٪ (۳) دیده شد.

نتایج حاصل از مقایسه آزمایش‌های سرولوژی و روش مولکولی:

در این مطالعه با مقایسه نتایج سرولوژی و ژنوتیپ، از



شکل ۴: کروماتوگراف حاصل از تعیین توالی اگزون ۱ ژن *RHCE* با استفاده از نرم افزار Chromas. در این نمونه در نوکلئوتید ۴۸ بازهای C و G وجود دارند که سبب می شود ژنوتیب این نمونه به صورت هتروزایگوت RHCE*/C/c شود.



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

تزریق خون مداوم، یک درمان حمایتی و مهم در بیماران تالاسمی می باشد. یکی از مهم ترین عوارض تزریق خون، آلوایمونیزاسیون است که به طور قابل توجهی دسترس 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، هم‌چنین آنتی‌بادی‌های

PCR در ایران صورت گرفت. در این مطالعه در ۲۶ نفر از بیماران، ۵۳ مورد ناسازگاری در آل‌های مختلف مشاهده شد که بیشترین ناسازگاری مربوط به گروه خونی Rh (۱۹ مورد) بود (۲۰).

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

آنجلابلستو 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 و 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 آل‌آنتی‌بادی 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 و ژنوتیپ این نمونه‌ها به ترتیب با استفاده از روش استاندارد سرولوژی و روش‌های

دیگر گروه خونی Rh به صورت Anti-C (۷٪)، Anti-e (۵٪)، Anti-c و Anti-e حدود ۱٪ مشخص گردید. کریمی و همکاران در مطالعه خود در سال ۲۰۰۷ میزان آل‌آیمنونیزاسیون را در جنوب ایران ۵/۳٪ گزارش کردند که بیشترین فراوانی آل‌آنتی‌بادی‌ها در گروه خونی Rh مربوط به Anti-D (۱۵٪) و Anti-E (۱۰٪) بود (۱۶). صادقان و همکاران در مطالعه خود در سال ۲۰۰۹، میزان آل‌آیمنونیزاسیون در شمال شرق ایران را ۲/۸۷٪ گزارش کردند که بیشترین فراوانی آل‌آنتی‌بادی مربوط به Anti-D (۸۸٪) 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 آل‌آنتی‌بادی و پس از آن Anti-D (۱۱٪) و Anti-E (۱۰٪) دارای بیشترین فراوانی بودند. هم چنین در این مطالعه درصد فراوانی سایر آل‌آنتی‌بادی‌های مربوط به گروه خونی Rh، ۱۵٪ گزارش گردید (۱۸). در مطالعه مروری که در سال ۲۰۱۶ توسط پورفتح‌اله و همکارانش انجام شد، میزان آل‌آیمنونیزاسیون در ایران ۱۰٪ گزارش شد که در این مطالعه بیشترین آل‌آنتی‌بادی‌ها مربوط به Anti-K (۳۷٪)، Anti-D (۲۹٪) و Anti-E (۲۰٪) بودند (۱۹). همان طور که مشاهده می‌شود، فراوانی آل‌آنتی‌بادی‌ها 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 آل (۲۲/۵٪) مربوط به گروه خونی Rh دارای تناقض بوده‌اند. این تناقضات ۷/۵٪ در آل C، ۶٪ در آل c، ۹/۵٪ در آل E و ۱/۶٪ در آل 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 آل‌های گروه‌های خونی فرعی Rh، Kell، Kidd، Duffy به دو روش هم‌آگلوتیناسیون و تعیین ژنوتیپ به روش RFLP

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 آلوایمونی‌زاسیون 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 حاصل طرح مصوب در مؤسسه ملی توسعه تحقیقات علوم پزشکی ایران با کد طرح ۹۴۲۶۴۴ مصوب سال ۱۳۹۵ بوده و هزینه‌های آن از محل این سازمان تامین گردیده است.

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. همان‌طور که گفته شد، در این مطالعه ۴۵ مورد ناسازگاری بین فنوتیپ و ژنوتیپ در آل‌های 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 همان‌طور که ذکر شد،

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

- 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, Jamalain 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.

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

¹Blood 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