خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۵ شماره ۲ تابستان ۹۷ (۱۰۴-۹۵)

مقاله پژوهشی

فراوانی آلل‌های D ضعیف در اهداکنندگان خون با روش‌های مولکولی

زهرا دانشور[۱]، ناصر امیری‌زاده[۲]، آرزو اودی[۳]، سمیرا گودرزی[۴]

چکیده

سابقه و هدف

از آن جایی که شناسایی آنتی‌ژن‌های D ضعیف می‌تواند از مصرف بی جای خون RhD منفی و تزریق نا به جای رگام در مادران جلوگیری نماید، تعیین فراوانی انواع آلل های D ضعیف در کشور ما ضروری به نظر می‌رسد. در این مطالعه فراوانی این آلل‌ها در بین اهداکنندگان خون ۲۱ استان ایران در سال ۱۳۹۵ از طریق آنالیز مولکولی بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی بود. تعداد ۱۰۵ نمونه خون دارای بیان ضعیف آنتی‌ژن D از اهداکنندگان خون جمع‌آوری و فنوتیپ نمونه‌ها از نظر آنتی‌ژن‌های D, C, c, E, e به وسیله روش‌های سرولوژیک تعیین گردید و سپس وجود آلل‌های مختلف مسئول ایجاد فنوتیپ D ضعیف به وسیله روش‌های مولکولی RFLP ، PCR-SSP و تعیین توالی DNA ارزیابی شدند.

یافته‌ها

بیشترین فراوانی مربوط به D ضعیف نوع ۱۵ (۳۸/۱٪) بود. نوع ۱ (۱۰/۴۸٪)، نوع ۵ (۷/۶۲٪)، نوع ۴ (۴/۷۶٪)، نوع ۸۰ (۳/۸٪)، نوع ۳ (۱/۹٪) و نوع ۱۱ ، ۸ ، ۱۰۰ هر کدام(۰/۹۵٪) بود. D ناقص با فراوانی DLO (۸/۵۷٪) و Va/DAU (۰/۹۵٪) دیده شد. نتایج این مطالعه هم چنین همراهی D ضعیف نوع ۱۵ را با آنتی‌ژن E و همراهی D ضعیف نوع ۱ و D ناقص DLO را با آنتی‌ژن C نشان داد.

نتیجه گیری

در این مطالعه تفاوت چشمگیری بین فراوانی واریانت‌های D ضعیف در بین اهداکنندگان خون کشور ما در مقایسه با جمعیت‌های سفید پوست اروپایی، آمریکایی و آفریقایی و هم چنین جمعیت آسیایی وجود دارد.

کلمات کلیدی: اهداکنندگان خون، ژنوتیپ، آلل‌ها

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۱۰
تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۰

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- 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
۳- 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
۴- کارشناس ارشد ایمونولوژی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

مقدمه

آنتی‌ژن D به دلیل خاصیت ایمنی زایی بالا یکی از مهمترین آنتی‌ژن‌های گروه خونی Rh از نظر اهمیت کلینیکی است که در ایجاد بیماری همولیتیک نوزادان HDFN (Hemolytic Disease of Fetus and New born) و واکنش‌های ناشی از انتقال خون HTR (Hemolytic Transfusion Reaction) نقش به سزائی دارد(۶-۱). HTR در اثر دریافت خون Rh مثبت توسط فرد Rh منفی و تولید آنتی‌بادی در بدن فرد Rh منفی، به دنبال آلوایمیونیزاسیون در مواجهه بعدی با خون Rh مثبت باعث همولیز در بدن گیرنده می‌شود. HDFN در نوزاد مادر Rh منفی که همسر Rh مثبت دارد، ممکن است دیده شود(۵). هر چند تقریباً ۹۰٪-۸۵٪ افراد جامعه Rh مثبت و حدود ۱۵٪-۱۰٪ به طور مشخص Rh منفی هستند ولی در آزمایشگاه‌های سرولوژی مواردی دیده می‌شوند که تحت عنوان D ضعیف طبقه‌بندی می‌گردید(۷). از نظر سرولوژیکی در D ضعیف، واکنش RBC با معرف آنتی D در مرحله اول منفی، کمتر یا مساوی ۲+ می‌باشد ولی با استفاده از آنتی هیومن گلوبولین (AHG) ایجاد آگلوتیناسیون متوسط یا شدید می‌کند (۱۲-۸). بروز تغییرات ژنتیکی و موتاسیون باعث تغییرات کمی یا کیفی در بیان سرولوژیکی آنتی‌ژن D می‌شوند که حاصل آن، انواع آلل‌های D واریانت است و در سه گروه اصلی D ناقص(partial D)، D ضعیف (weak D) و Del طبقه‌بندی می‌شوند(۱۰، ۷). در نوع D ضعیف، تغییر کمی در بیان آنتی‌ژن D صورت گرفته یعنی فقط تعداد آنتی‌ژن D بر سطح RBC کاهش یافته ولی ساختارش تغییر نکرده در حالی که در نوع D ناقص تغییر کیفی در آنتی‌ژن D ایجاد شده است، لذا این افراد در مواجهه با RBC دارای آنتی‌ژن D، تولید آنتی‌بادی می‌کنند(۷،۱۰).

تا به امروز ۱۴۷ نوع D ضعیف شناسایی شده است که برخی انواع دارای زیر گروه هستند(۱۰، ۶). میزان این فنوتیپ در نژادها و اقوام مختلف متفاوت است به عنوان مثال در قفقازی‌ها میزان شیوع آن ۰/۲٪ تا ۱٪ است و اکثریت با نوع ۱، ۲ و ۳ می‌باشد(۱۵-۱۳، ۷). مطالعه‌ها نشان می‌دهد گیرندگان خون دارای D ضعیف نوع ۱، ۲ و ۳ چه به صورت هموزیگوت و چه هتروزیگوت وقتی RBC های RhD مثبت دریافت می‌کنند، در معرض خطر تولید آلوآنتی D نیستند و فقط در افراد دارای انواع ۴/۲ ، ۱۱ ، ۱۵ ، ۲۱ و ۵۷ در صورت دریافت خون Rh مثبت تولید آنتیD دیده شده است(۲۰-۱۶). از آن جایی که روش‌های سرولوژیک قادر به تعیین نوع D ضعیف نمی‌باشند، لذا با تعیین ژنوتیپ و اثبات نوع D ضعیف می‌توان در مصرف بی‌جای خون RhD منفی صرفه جویی کرد و نیز در مادران دارای فنوتیپ D ضعیف که نوزاد RhD مثبت به دنیا آورده‌اند یا دارای جنین RhD مثبت هستند، نیاز به تزریق روگام(که یک فرآورده مشتق از پلاسما و دارای خطرات بالقوه انتقال بیماری‌ها می‌باشد) نیست و در مصرف آن نیز صرفه‌جویی می‌شود(۱۰، ۷).

D ضعیف شایع‌ترین نوع D واریانت در امریکا و اروپاست که در یک برآورد ۳٪ از افراد RhD منفی را تشکیل می‌دهد. از این میزان ۸۰٪ از نوع ۱ ، ۲ و۳ هستند ولی تاکنون آماری درباره فراوانی آلل‌های D ضعیف در ایران گزارش نشده است(۷). در این مطالعه فراوانی انواع آلل‌های D ضعیف در نمونه‌های اهداکنندگان خون با بیان ضعیف آنتی‌ژنD با روش‌های مولکولی PCR-SSP ، PCR-RFLP و تعیین توالی DNA مشخص شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها:

در یک مطالعه توصیفی، تعداد ۱۰۵ نمونه از اهداکنندگان خون دارای فنوتیپ D ضعیف که به انتقال خون استان تهران (۶۳ نمونه) و ۱۱ استان دیگر شامل استان‌های آذربایجان غربی (۷ نمونه)، مرکزی (۱ نمونه)، قزوین (۴ نمونه)، یزد (۸ نمونه)، اردبیل (۲ نمونه)، قم (۴ نمونه)، خوزستان (۱ نمونه)، اصفهان (۵ نمونه)، خراسان جنوبی (۷ نمونه)، سیستان و بلوچستان (۲ نمونه) و هرمزگان (۱ نمونه) مراجعه کرده بودند، انتخاب گردید. از اهداکنندگان خون دارای فنوتیپ D ضعیف مقدار ۵ میلی‌لیتر نمونه خون کامل EDTA دار جمع‌آوری شد.

تعیین فنوتیپ:

ابتدا سوسپانسیون ۵٪-۳٪ (در سرم فیزیولوژی)

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

جدول ۱: توالی آغازگرهای D ضعیف نوع ۱ تا ۵ (حروف کوچک نواحی داخل اینترون را نشان می‌دهد)

D ضعیف نوع ۱	جلوبرنده	acacgctatttctttgcagACTTATGG
	معکوس	GGTACTTGGCTCCCCCGAC
D ضعیف نوع ۲	جلوبرنده	ctccaaatcttttaacattaaattatgcatttaaacagC
	معکوس	gtgaaaaatcttacCTTCCAGAAAACTTGGTCATC
D ضعیف نوع ۳	جلوبرنده	acagagacggacacaggATGAGATG
	معکوس	CTTGATAGGATGCCACGAGCCC
D ضعیف نوع ۴	جلوبرنده	AGACTACCACATGAACATGATGCACA
	معکوس	CAGACAAACTGGGTATCGTTGCTC
D ضعیف نوع ۵	جلوبرنده	GGTGCTGGTGGAGGTGACGGA
	معکوس	gagcttttggccctttctccc

گلبول‌های قرمز اهداکنندگان تهیه و سپس کلیه نمونه‌ها که با آنتی – D (ایمیونودیاگنوستیکا ، GmbH) واکنش منفی نشان دادند، با آنتی هیومن گلوبولین آزمایش شدند و با دیدن آگلوتیناسیون قوی در این مرحله، نمونه‌های D ضعیف مشخص شدند. قبل از آزمایش D ضعیف، آزمایش کومبس مستقیم جهت اطمینان از عدم حضور آنتی‌بادی یا اجزای کمپلمان در سطح گلبول‌های قرمز انجام شد. سپس فنوتیپ هر نمونه با استفاده از آنتی -C، آنتی-c، آنتی-E و آنتی-e تولید شرکت ایمیونودیاگنوستیکا، GmbH تعیین شد. مراحل آزمایش بر اساس دستورالعمل‌های شرکت سازنده کیت با روش استاندارد لوله‌ای انجام و نتایج ثبت گردید.

به منظور استخراج DNA از خون کامل یا بافی‌کوت، از Nucleic Acid purification kit محصول شرکت 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 ۲۵- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

روش PCR-SSP جهت تعیین آلل‌های شایع D ضعیف:

بر روی کلیه نمونه‌ها پس از استخراج DNA با استفاده از آغازگرهای D ضعیف نوع ۱ تا ۵ به دست آمده از مقاله مولر و همکارانش در سال ۲۰۰۱، آزمایش مولکولی PCR-SSP (Single Specific Primer) انجام شد(۱۴) (جدول ۱). جهت کنترل از هورمون رشد انسانی استفاده شد. حجم کلی واکنش PCR ، ۲۵ µL و شامل: ۱۲/۵ µL از Master Mix 2X PCR ، غلظت ۶۰ ng DNA و آغازگر جلوبرنده و معکوس ۰/۲ میکرو مولار بود. سپس طبق برنامه دمایی زیر در دستگاه ترمال سایکلر مراحل تکثیر انجام شد: ۱ چرخه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و ۱۰ چرخه (در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، در ۶۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه) و ۲۰ چرخه (در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه). بعد از انجام واکنش PCR محصولات به دست آمده با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۲٪ بررسی شدند.

تعیین توالی DNA (DNA sequencing):

به منظور تایید آزمایش مولکولی PCR-SSP و نیز تعیین موتاسیون‌های موارد منفی که با آغازگر ۱ تا ۵ D ضعیف باند نداده بودند بر روی همه نمونه‌ها، تکثیر اگزون‌های ۱، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۹ انجام و جهت سکانس ارسال شد. آغازگرهای تکثیر اگزون از مقاله آندریا دوچر و همکارانش (سال ۲۰۰۵) برداشت شد(۲۱). طبق برنامه دمایی زیر در دستگاه ترمال سایکلر مراحل تکثیر انجام شد: ۱ چرخه در

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و ۳۵ چرخه(در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه) و ۱ چرخه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه. نتیجه تعیین توالی با برنامه کروماس بررسی شد و در صورت مشاهده موتاسیون و مکان‌یابی آن، نوع آلل D ضعیف مشخص شد.

روش PCR- RFLP جهت تعیین آلل‌های شایع D ضعیف:

روش PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) بر روی نمونه‌های دارای فراوانی بالای D ضعیف شامل نوع ۵ و ۱۵ انجام شد تا به این وسیله نتایج به دست آمده از PCR-SSP تائید گردند. آغازگرهای rb20d/rb21d که از مقاله وگنر و همکارانش در سال ۱۹۹۹ به دست آمده بود، جهت D ضعیف نوع ۵ به کار رفت(۱۳). قطعه‌ای به طول ۲۱۰ bp تکثیر شد که در فرد Rh مثبت به وسیله آنزیم AluI برش خورد و دو قطعه bp ۸۰ و bp ۱۳۰ ایجاد شد ولی در فرد حامل آلل D ضعیف نوع ۵ به دلیل موتاسیون جایگاه برش آنزیم از بین رفته است. از آن جایی که روشPCR-RFLP جهت تایید D ضعیف نوع ۱۵ برای اولین بار انجام شد به این منظور با استفاده از آغازگرهای زیر اگزون ۶ ژن *RHD* تکثیر گردید:

آغازگر جلوبرنده: 5′-cagtagtgagctggcccatca-3′

و آغازگر معکوس: 5′–ccttcagccaaagcagaggagg-3′

طبق برنامه دمایی زیر در دستگاه ترمال سایکلر، مراحل تکثیر انجام شد: ۱ چرخه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و ۳۵ چرخه (در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه PCR_ RFLP ، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه) و ۱ چرخه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه. محصول این PCR قطعه‌ای به طول bp ۳۷۲ تکثیر می‌کند که در فرد Rh مثبت به وسیله آنزیم KpnI برش می‌خورد و دو قطعه به طول bp 132 و bp ۲۴۰ ایجاد می‌کند ولی در فرد حامل آلل D ضعیف نوع ۱۵ بـه دلیل موتاسیون، جایگاه برش آنزیم از بین رفته است.

یافته‌ها

نتایج مربوط به فراوانی فنوتیپ D,C,E,c,e در بین نمونه‌های D ضعیف:

در بین ۱۰۵ نمونه D ضعیف، فنوتیپ DccEe (۴۶/۶۷٪) بیشترین فراوانی و بعد از آن به ترتیب فنوتیپ DCcee (۳۳/۳۳٪) ، فنوتیپ Dccee (۸/۵۷٪)، فنوتیپ DCCee (۶/۶۷٪) و فنوتیپ DccEE (۳/۸٪) فراوانی بالایی را دارا بودند. کمترین فراوانی مربوط بـه فنوتیپ DCcEe (۹۵٪) بود.

نتایج مربوط به آزمایش مولکولی PCR-SSP :

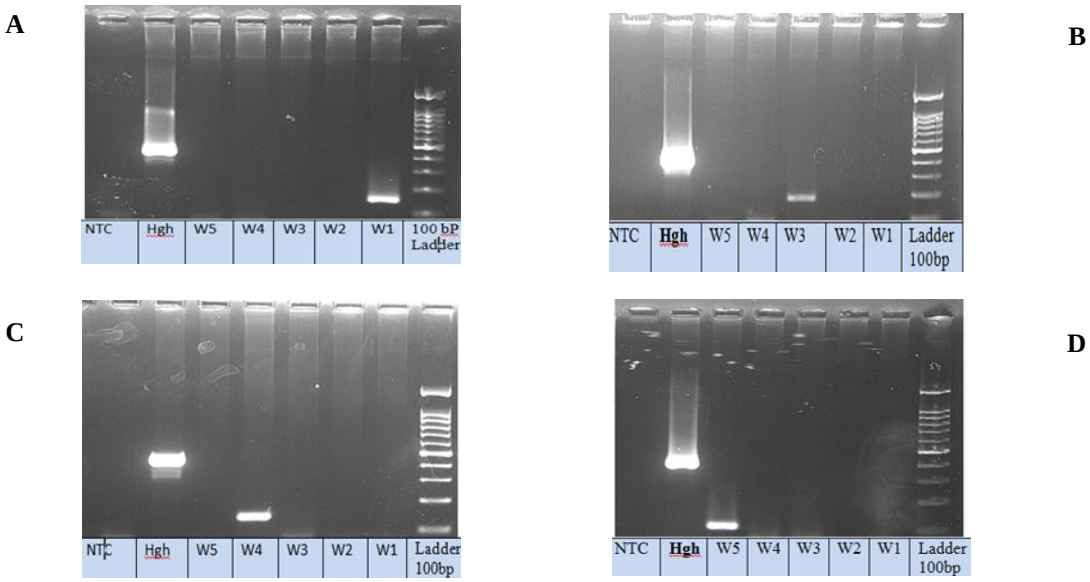
از بین ۱۰۵ نمونه، فقط ۲۶ نمونه D ضعیف نوع ۱ تا ۵ بودند که از این تعداد ۱۱ نمونه (۱۰/۴۸٪) D ضعیف نوع ۱ ، ۸ نمونه (۷/۶۲٪) D ضعیف نوع ۵، ۵ نمونه(۴/۷۶٪) D ضعیف نوع ۴ و ۲ نمونه(۱/۹٪) D ضعیف نوع ۳ بودند. شایان ذکر است که در بین نمونه‌ها، نمونه D ضعیف نوع ۲ دیده نشد. نتایج PCR-SSP ، مربوط به ۴ نمونه D ضعیف انواع ۱، ۳، ۴ و ۵ در شکل آمده است(شکل ۱).

نتایج مربوط به تعیین توالی DNA اگزون‌های مختلف ژن RHD :

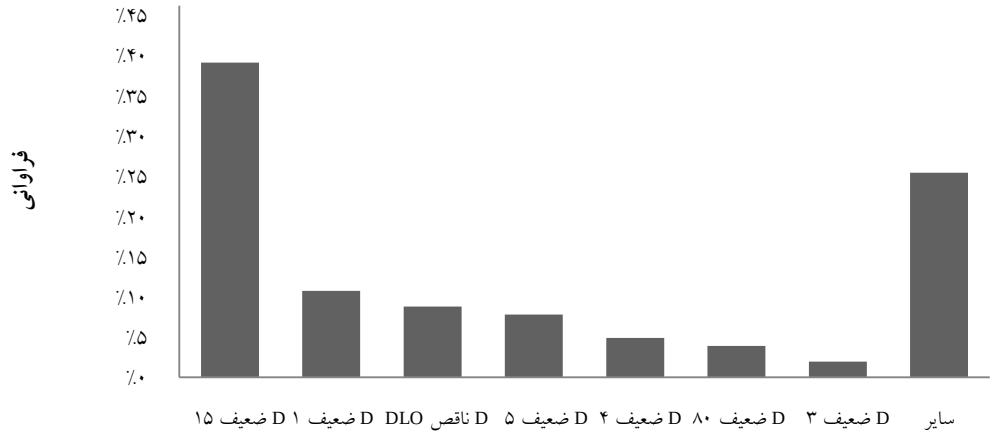
به منظور تایید آزمایش مولکولی PCR-SSP (۲۶ نمونه D ضعیف نوع ۱ تا ۵) و نیز تعیین سایر آلل‌های D ضعیف که با روش PCR-SSP قابل تشخیص نبودند(۷۹ نمونه)، تعیین توالی DNA انجام شد و نتایج به دست آمده با برنامه کروماس بررسی گردید.

نتایج این مطالعه وجود ۹ آلل مختلف D ضعیف و دو نوع آلل D ناقص را نشان داد. بیشترین فراوانی مربوط بـه D ضعیف نوع ۱۵ (۳۸/۱٪) بود. بعد از آن بـه ترتیب D ضعیف نوع ۱ (۱۰/۴۸٪)، D ضعیف نوع ۵ (۷/۶۲٪)، D ضعیف نوع ۴ (۴/۷۶٪)، D ضعیف نوع ۸۰ (۳/۸٪)، D ضعیف نوع ۳ (۱/۹٪) و D ضعیف نوع ۱۱، ۸ و ۱۰۰ هر کدام (۰/۹۵٪) قرار داشتند(نمودار ۱). دو نوع D ناقص یافت شده در بین نمونه‌ها، D ناقص DLO با فراوانی در حد(۸/۵۷٪) و D ناقص Va/DAU با فراوانی فقط (۰/۹۵٪) قرار داشتند.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]



شکل ۱ : نتایج PCR-SSP، ۴ نمونه D ضعیف انواع ۱، ۳، ۴و۵ را نشان می دهد. اولین چاهک از سمت راست ladder 100 bp می‌باشد وبعد از آن به ترتیب نتایج مربوط به PCR-SSP با آغازگرهای D ضعیف انواع ۱، ۲، ۳ ، ۴ و ۵، هورمون رشد(Hgh) و آخرین چاهک کنترل منفی می باشد. شکل A: D ضعیف نوع ۱ ، شکل B: D ضعیف نوع ۳ ، شکل C: D ضعیف نوع ۴، شکل D: D ضعیف نوع ۵.

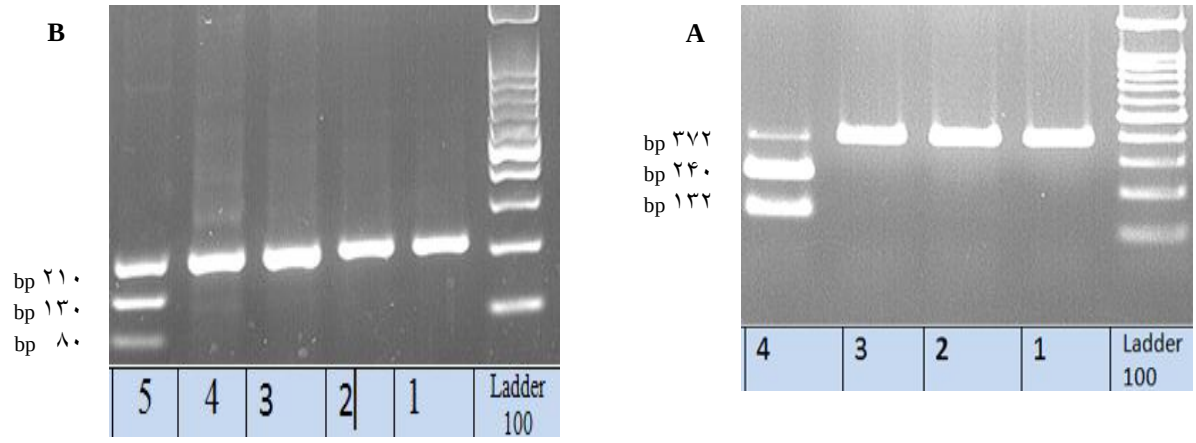


نمودار ۱: فراوانی انواع D ضعیف در بین اهداکنندگان خون استان تهران و سایر استان‌ها

نتایج مربوط به آزمایش مولکولی PCR-RFLP :

به منظور راه اندازی آزمایش، PCR- RFLP فقط بر روی نمونه‌های D ضعیف ۵ و ۱۵ انجام شد. در فرد Rh مثبت برش با آنزیم AluI دو قطعه ۸۰ bp و ۱۳۰ bp ایجاد می‌کند ولی در D ضعیف نوع ۵ ، محل برش آنزیم AluI به دلیل جایگزینی نوکلئوتیدی از بین رفته است. هم چنین در فرد Rh مثبت برش با آنزیم KpnI دو قطعه ۱۳۲ bp و ۲۴۰ bp ایجاد می‌کند ولی در D ضعیف نوع ۱۵ محل برش آنزیم KpnI به دلیل جایگزینی نوکلئوتیدی از بین رفته است(شکل ۲).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]



شکل ۲: نتایج مربوط به PCR- RFLP نمونه‌های D ضعیف ۵ و ۱۵ . شکل A : نتایج PCR-RFLP مربوط به D ضعیف نوع ۱۵. ردیف‌های ۱، ۲ و ۳ مربوط به سه نمونه D ضعیف نوع ۱۵، قطعه bp ۳۷۲ که جایگاه برش آنزیم KpnI را ندارد . – ردیف ۴ مربوط به نمونه Rh مثبت دارای دو قطعه bp ۱۳۲ و bp ۲۴۰ پس از برش با آنزیم KpnI. شکل B : نتایج PCR-RFLP مربوط به D ضعیف نوع ۵ – ردیف‌های ۱ ، ۲، ۳ و ۴ مربوط به ۴ نمونه D ضعیف نوع ۵: قطعه bp ۲۱۰ که جایگاه برش آنزیم AluI را ندارد. – ردیف ۵ مربوط به نمونه Rh مثبت دارای دو قطعه bp ۸۰ و bp ۱۳۰ پس از برش با آنزیم AluI.

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که از بین ۱۰۵ نمونه دارای فنوتیپ D ضعیف، فقط ۱۳ نمونه(۱۲/۴٪) D ضعیف نوع ۱ و نوع ۳ بودند و هیچ نمونه D ضعیف نوع ۲ در بین این افراد مشاهده نشد. این در حالی است که مطالعه‌های متعدد انجام شده در کشورهای اروپایی و آمریکایی فراوانی بین ۹۰٪–۶۷٪ را برای D ضعیف نوع ۱، ۲و ۳ (با خطر آلوایمیونیزاسیون همراه نمی‌باشند) گزارش نموده‌اند که اختلاف زیادی با نتایج به دست آمده در مطالعه ما دارد(۲۳، ۲۲، ۱۴، ۱۳، ۷). هم چنین نتایج این تحقیق نشان داد هر ۱۳ نمونه D ضعیف نوع ۱و ۳ دارای آنتی ژن C می‌باشند، که فرانس وگنر در مطالعه خود در سال ۱۹۹۹ نیز به این یافته اشاره نموده است(۱۳).

در مطالعه حاضر شایع‌ترین نوع D ضعیف مربوط به D ضعیف نوع ۱۵ (G>A ۸۴۵) با فراوانی ۳۸٪ بود. این در حالی است که در مطالعه‌هایی که در جمعیت‌های سفید پوست انجام شده است، فراوانی این نوع D ضعیف کمتر از ۲٪ گزارش شده است(۲۴–۱۳). فقط در مطالعه‌ای که توسط آگنیزکا ارزینسکا و همکاران در سال ۲۰۱۳ در کشور لهستان انجام شده بود، فراوانی D ضعیف نوع ۱۵ در بین اهداکنندگان خون دارای ژن *RHD* ، ۱۹٪ گزارش شده است(۲۵). فراوانی D ضعیف نوع ۱۵ در بین کشورهای آسیایی بالاتر از کشورهای اروپایی می‌باشد، به طور مثال فراوانی D ضعیف نوع ۱۵ در کشور چین بسیار متغیر و بین ۵۶٪–۷/۹٪ گزارش شده است. در افراد دارای آلل D ضعیف نوع ۱۵ (Gly۲۸۲ Asp) به دلیل تعداد کم آنتی‌ژن D بر روی گلبول قرمز، در صورت دریافت خون Rh^+ آلوایمیونیزاسیون دیده می‌شود(۱۸، ۱۶).

از لحاظ فراوانی سایر آنتی‌ژن‌های سیستم Rh ، نتایج این مطالعه نشان داد از بین ۴۰ نمونه D ضعیف نوع ۱۵، به جز یک نمونه بقیه همه دارای آنتی‌ژن E بودند. این یافته، یافته‌ای است که در مطالعه‌ای در سال ۱۹۹۹ که برای اولین بار اساس مولکولی انواع فنوتیپ‌های D ضعیف را شرح داده است، به آن اشاره شده است(۱۳). ارزینسکا و همکاران در سال ۲۰۱۳ در مطالعه‌ای که در کشور لهستان انجام دادند، به همراهی آنتی‌ژن E با آلل مربوط به D ضعیف نوع ۱۵ اشاره داشته‌اند(۲۵). هم چنین سان جی‌دی و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش نمودند که ۸۹٪ افراد دارای آلل مربوط به D ضعیف نوع ۱۵ آنتی‌ژن E را دارا می‌باشند(۲۶).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

در مطالعه‌ای که توسط اُرزینسکا و همکاران در سال ۲۰۱۳ در کشور لهستان انجام شده بود فراوانی D ضعیف نوع ۱۵ در بین اهداکنندگان خون دارای ژن *RHD* ، ۱۹٪ گزارش شده است(۲۵). فراوانی D ضعیف نوع ۱۵ در بین کشورهای آسیایی بالاتر از کشورهای اروپایی می‌باشد، به طور مثال فراوانی D ضعیف نوع ۱۵ در کشور چین بسیار متغیر و بین ۵۶٪-۷/۹٪ گزارش شده است. در افراد دارای آلل D ضعیف نوع ۱۵ (Gly۲۸۲ Asp) به دلیل تعداد کم آنتی‌ژن D بر روی گلبول قرمز، در صورت دریافت خون Rh^+ آلوایمیونیزاسیون دیده می‌شود (۱۸، ۱۶).

از لحاظ فراوانی سایر آنتی‌ژن‌های سیستم Rh ، نتایج این مطالعه نشان داد از بین ۴۰ نمونه D ضعیف نوع ۱۵، به جز یک نمونه بقیه همه دارای آنتی‌ژن E بودند. این یافته، یافته‌ای است که در مطالعه وگنر در سال ۱۹۹۹ که برای اولین بار اساس مولکولی انواع فنوتیپ‌های D ضعیف را شرح داده است، به آن اشاره شده است(۱۳). اُرزینسکا و همکاران در سال ۲۰۱۳ در مطالعه‌ای که در کشور لهستان انجام دادند، به همراهی آنتی‌ژن E با آلل مربوط به D ضعیف نوع ۱۵ اشاره داشته‌اند(۲۵). هم چنین سانجی‌دی و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش نمودند که ۸۹٪ افراد دارای آلل مربوط به D ضعیف نوع ۱۵، آنتی‌ژن E را دارا می‌باشند(۲۶).

شی‌هویه و همکاران در سال ۲۰۱۴ نیز گزارش نمودند به جز دو مورد از ۶۴ مورد D ضعیف نوع ۱۵، همه موارد دارای آنتی‌ژن E می‌باشند (۲۷). نتایج این مطالعه نشان داد بعد از D ضعیف نوع ۱۵ و ۱ ، سومین واریانت شایع مربوط به D ناقصDLO با فراوانی ۸/۵۷٪ می‌باشد(D ناقص C>T ۸۵۱). DLO با فراوانی کمتر از یک درصد در جمعیت سفید پوست، اولین بار توسط انصارت ـ پیرن و همکاران در سال ۲۰۰۴ در کشور فرانسه گزارش شد. افراد دارای این واریانت قادر به تولید آلوآنتی D می‌باشند(۲۲). نکته قابل توجه این است که ۵۰٪ موارد D ناقص DLO در مطالعه حاضر مربوط به استان خراسان جنوبی بود. هم چنین همه ۱۰ نمونه گزارش شده دارای آنتی‌ژن C بودند که این یافته نیز با مطالعه پیرن هماهنگی داشت(۲۲).

در این مطالعه D ضعیف نوع ۵ (C>A ۴۴۶) فراوانی ۷/۶۲٪ را نشان داد که با فراوانی گزارش شده (کمتر از یک درصد) توسط فرانس وگنر در سال ۱۹۹۹ در جمعیت سفید پوست اروپایی دارای فنوتیپ D ضعیف اختلاف زیادی دارد(۱۳). مونا اکاری و همکاران در سال ۲۰۱۵ فراوانی ۲/۷٪ را برای D ضعیف نوع ۵ در بین اهداکنندگان تونس، دارای فنوتیپ D ضعیف گزارش نمود (۲۸).

همه ۸ نمونه D ضعیف نوع ۵ گزارش شده دارای آنتی‌ژن E بودند که این یافته نیز با دو مطالعه فوق هماهنگی داشت(۲۸، ۱۳). شایان ذکر است از این ۸ نمونه، ۷ نمونه مربوط به اهداکنندگان استان تهران بودند.

فراوانی D ضعیف نوع ۴ با دو نوع موتاسیون(۶۰۲ C>G) و(۶۶۷ T>G) در این مطالعه ۴/۷۶٪ به دست آمد. فرانس وگنر در سال ۱۹۹۹ در جمعیت سفید پوست اروپایی دارای فنوتیپ D ضعیف، فراوانی D ضعیف نوع ۴ با دو نوع موتاسیون (C>G۶۰۲) و (T>G ۶۶۷) را ۱/۳٪ گزارش نموده است(۱۳).

ایمان حسین و همکاران در سال ۲۰۱۳ فراوانی انواع D ضعیف نوع ۴ را در کشور مصر جمعاً ۴۸٪ گزارش نمود در حالی که بیشترین فراوانی در این کشور مربوط به انواع D ناقص می‌باشد. نتایج این مطالعه با فراوانی به دست آمده در مطالعه ما اختلاف زیادی را نشان می‌دهد (۲۹). هم چنین مونا اکاری و همکاران در سال ۲۰۱۵ شایع‌ترین نوع D ضعیف در بین اهداکنندگان خون کشور تونس را D ضعیف نوع ۴ (۷۳/۹۱٪) با انواع مختلف موتاسیون‌ها گزارش نمودند(۲۸). هم‌کر و همکارانش در سال ۱۹۹۹ گزارش نمودند که این موتاسیون‌ها در بین سیاه‌پوستان آفریقایی بعد از انواع D ناقص بیشترین فراوانی را دارد(۳۰). کارین پریسکو آرنونی و همکاران در سال ۲۰۱۴ نیز فراوانی انواع D ضعیف نوع ۴ را بیش از ۵۰٪ در بین سیاهپوستان کشور برزیل گزارش نمودند(۳۱).

مونا اکاری و همکاران در تحقیق دیگری که در سال ۲۰۱۷ انجام دادند، فراوانی انواع D ضعیف نوع ۴ را در تونس ۹۰٪ اعلام کردند که ۸۸٪ آن، D ضعیف نوع ۴/۰ بود و توصیه کردند افراد دارای D ضعیف نوع ۴/۰ می‌توانند بدون خطر آلوایمیونیزاسیون، خون Rh مثبت

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

دریافت کنند(۳۲). نتایج این مطالعه‌ها در مقایسه با جمعیت مورد مطالعه ما تفاوت چشمگیری را برای فراوانی انواع D ضعیف نوع ۴ نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری

تفاوت چشمگیری بین فراوانی واریانت‌های D ضعیف در بین اهداکنندگان خون کشور ما در مقایسه با جمعیت‌های سفید پوست اروپایی و آمریکایی با فراوانی بالای انواع D ضعیف(۱، ۲ و ۳) جمعیت آفریقایی با فراوانی بالای انواع D ناقص و D ضعیف نوع ۴ و هم چنین جمعیت آسیایی با فراوانی بالای Del وجود دارد(۱۰).

تشکر و قدردانی

از زحمات همکاران بخش اتوماسیون و سرولوژی اختصاصی انتقال خون استان تهران، بخش ایمونوهماتولوژی ستاد مرکزی سازمان انتقال خون و همکاران بخش اتوماسیون و سرولوژی اختصاصی در مراکز انتقال خون استان‌های آذربایجان غربی، مرکزی، قزوین، یزد، اردبیل، قم، خوزستان، اصفهان، خراسان جنوبی، سیستان و بلوچستان و هرمزگان که با ارسال نمونه ما را یاری کردند، صمیمانه سپاسگزاریم. این طرح در کمیته دانشگاهی اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون با کد IR.TMI.REC.1395.023 مجوز گرفته است.

References:

1- Johnson ST, Wiler M. The Rh Blood Group System. In: Harmening D. Modern Blood Banking & Transfusion Practices. 6th ed. Philadelphia: F. A. Davis Company; 2012. p. 149-71.
2- Westhoff C M. The Structure and Function of the Rh antigen Complex. Semin Hematol 2007; 44(1): 42–50.
3- Klein HG, Anstee DJ. Mollison's Blood transfusion in clinical medicine. 12th ed. Bristol: Wiley Blackwell; 2008. p. 167-80.
4- Westhoff CM, Reid ME. Rh, Kell, Duffy, and Kidd Antigens and Antibodies. In: Hillyer CD, Silberstein L E, Ness PM, Anderson KC, Roback JD. Blood Banking and Transfusion Medicine. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2007. p. 80-7.
5- Fichou Y, Marechal C, Jamet D. Establishment of a medium-throughput approach for the genotyping of RHD variants and report of nine novel rare alleles. Transfusion 2013; 53: 1821-8.
6- Sandler G, Chen L N, Flegel WA. Serological weak D phenotypes: a review and guidance forinterpreting the RhD blood type using the RHD genotype. Br J Haematol 2017; 179(1): 10-9.
7- Sandler G, Flegel WA, Westhoff C. It's time to phase in RHD genotyping for patients with a serologic weak D phenotype. Transfusion 2015; 55: 680-9.
8- Garratty G. Do we need to be more concerned about weak D antigens? Transfusion 2005; 45: 1547-51.
9- Flegel WA. Molecular genetics and clinical applications for RH. Transfus Apher Sci 2011; 44: 81-91.
10- Daniels G. Variants of RhD-current testing and clinical consequences. Br J Haematol 2013; 161: 461-7.
11- Jenkins CM, Johnson ST, Bellissimo DB, Gottschall JL. Incidence of weak D in blood donors typed as D positive by the Olympus PK 7200. Immunohematology 2005; 21(4): 152-4.
12- Denomme GA, Westhoff CM. The Rh System. In: Fung MK, Grossman BJ, Hillyer CD, Westhoff CM. Technical Manual. 18th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks; 2014. p. 317-36.
13- Wagner FF, Gassner C, Müller TH, Schönitzer D, Schunter F, Flegel WA. Molecular basis of weak D phenotypes. Blood 1999; 93(1): 385-93.
14- Müller TH, Wagner FF, Trockenbacher A, Eicher NI, Flegel WA, Schönitzer D, *et al*. PCR screening for common weak D types shows different distributions in three Central European populations. Transfusion 2001; 41(1): 45-52.
15- Flegel WA. Blood group genotyping in Germany. Transfusion 2007; 47(1 Suppl): 47S-53S.
16- Flegel WA. How I manage donors and patients with a weak D phenotype. Curr Opin Hematol 2006; 13(6): 476-83.
17- Avent ND, Martinez A, Flegel WA, Olsson ML, Scott ML, Nogués N, *et al*. The Blood Genproject: toward mass scale comprehensive genotyping of blood donors in the European Union and beyond. Transfusion 2007; 47(Suppl 1): 40S-6S.
18- Wagner FF, Frohmajer A, Ladewig B, Eicher NI, Lonicer CB, Müller TH, *et al*. Weak D allele's express distinct phenotypes. Blood 2000; 95(8): 2699-708.
19- McGann H, Wenk RE. Alloimmunization to the D antigen by a patient with weak D type 21. Immunohematology 2010; 26: 27-9.
20- Le Maréchal C, Guerry C, Benech C, Burlot L, Cavelier B, Porra V, *et al*. Identification of 12 novel RHD alleles in western France by denaturing high-

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

performance liquid chromatography analysis. Transfusion 2007; 47(5): 858-63.
21- 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.
22- Ansart-Pirenne H, Asso-Bonnet M, Le Pennec PY, Roussel M, Patereau C, Noizat-Pirenne F. RhD variants in whites: consequences for checking clinically relevant alleles. Transfusion 2004; 44(9): 1282-6.
23- Van Sandt VS, Gassner C, Emonds MP, Legler TJ, Mahieu S, Körmöczi GF. RHD variants in Flanders, Belgium. Transfusion 2015; 55(6 Pt 2): 1411-7.
24- Chrisenstian M, Samuelsen B, Chrisenstian L, Morbjerg T, Bredahl C, Grunnet N. Correlation between serology and genetics of weak D types in Denmark. Transfusion 2008; 48(1): 187-93.
25- Orzińska A, Guz K, Polin H, Pelc-Kłopotowska M, Bednarz J, Gieleżyńska A, *et al*. RHD variants in polish Blood Donors routinely typed as D negative. Transfusion. 2013 November; 53(11 Suppl 2): 2945-53.
26- Sun GD, Duan XM, Zhang YP, Yin ZZ, Niu XL, Li YF, *et al*. Molecular background of weak D type 15 as the predominant weak D type found in Chinese population. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 2006; 14(5): 1024-8. [Article in Chinese]
27- Ye SH, Wu DZ, Wang MN, Wu XY, Xu HG, Xu H, *et al*. A comprehensive investigation of RHD polymorphisms in the Chinese Han population in Xi'an. Blood Transfus 2014; 12(3): 396-404.
28- Ouchari M, Romdhane H , Chakroun T, Abdelkefi S, Houissa B, Hmida S, *et al*. Weak D in Tunisian population. Blood Transfus 2015; 13(2): 295-301.
29- Hussein E, Teruya J. Weak D type in the Egyptian Population. Am J Clin Pathol 2013; 139(6): 806-11.
30- Hemker MB, Ligthart PC, Berger L, van Rhenen DJ, van der Schoot CE, Wijk PA. DAR, a new RhD variant involving exons 4, 5, and 7, often in linkage with ceAR, a new Rhce variant frequently found in African blacks. Blood 1999; 94(12): 4337-42.
31- Arnoni CP, Latini FR, Muniz JG, Gazito D, Person Rde M, de Paula Vendrame TA, *et al*. How do we identify RHD variants using a practical molecular approach? Transfusion 2014; 54(4): 962-9.
32- Ouchari M, Srivastava K, Romdhane H, Jemni Yacoub S, Flegel WA. Transfusion strategy for weak D Type 4.0 based on RHD alleles and RH haplotypes in Tunisia. Transfusion 2018; 58(2): 306-12.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2018; 15(2): 95-104

Original Article

Frequency of Weak D alleles in Blood Donors by Molecular methods

Daneshvar Z.[1], Amirizadeh N.[1], Oodi A.[1], Goudarzi S.[1]

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

Abstract

Background and Objectives

Detection of weak D blood type can lead to the saving of RhD negative blood components and can reduce RhIG consumption. Therefore, determining the frequency of weak D alleles in our country is necessary.

Materials and Methods

In this descriptive study, a total of 105 blood samples with weak expression of D antigen from 21 provinces among Iranian blood donors were studied. The phenotype of samples was tested for Rh D, C, c, E and e antigens by routine serological methods. Weak D variants were evaluated by PCR-SSP, RFLP and DNA sequencing methods.

Results

Among 105 weak D samples, 9 weak D alleles and 2 partial D alleles were found. The most prevalent weak D type in our population was weak D type 15(38.1%), weak D Type 1(10.48%), Type 5(7.62%), Type 4 (4.76%), Type 80 (3.8%), Type 3 (1.9%) and Type 11 , Type 8 , Type 100 each (0.95%) and Partial D DLO (8.57%), and partial D V a /DAU (0.95%). We also observed the correlation between weak D type 15 and E antigen and weak D type 1 and Partial D DLO and C antigen.

Conclusions

There is a significant difference between the prevalence of Weak D variants among our blood donors compared to European and American white populations with a high incidence of weak D 1, 2 and 3, equally compared to African population with a high incidence of Partial D and weak D type 4, as well as Asian population with a high prevalence of Del.

Key words: Blood Donors, Genotype, Alleles

Received: 31 Dec 2017
Accepted: 30 Jan 2018

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*

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) 88601599; Fax : (+9821) 88601599
E-mail: *ar.oody@gmail.com*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]