

بررسی ژنوتیپ سیستم گروه خونی Kell در بیماران تالاسمی دارای آلوآنتی بادی

ریحانه صریحی^۱، ناصر امیری زاده^۲، آرزو اودی^۳

چکیده

سابقه و هدف

آلوایمیونیزاسیون، برجسته ترین عارضه بالینی در بیماران تالاسمی محسوب می گردد و Anti-K فراوان ترین آنتی بادی در این بیماران می باشد. لذا ارزیابی دقیق این آنتی ژن می تواند سبب کاهش چشمگیر موارد آلو-ایمیونیزاسیون گردد. روش های ژنوتیپ با غلبه بر محدودیت های روش سرولوژیک، سبب تسهیل تعیین گروه در این بیماران شده و می تواند راهنمای خوبی جهت شناسایی واحدهای خون سازگار باشد. در این بررسی آنتی ژن های K و k با روش های سرولوژیک و مولکولی بررسی شده و نتایج مورد مقایسه قرار گرفتند.

مواد و روش ها

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

یافته ها

در این مطالعه Anti-K (۲۸٪) شایع ترین آنتی بادی 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 آنتی بادی ها علیه آنتی ژن K هم چنان در بیماران تالاسمی به میزان بالایی پیدا می شود. یافته ها بیان نمود که ژنوتیپ مولکولی RBC نسبت به فنوتیپ سرولوژیک برتری دارد و به خصوص در بیمارانی مانند بیماران تالاسمی که دفعات زیادی خون می گیرند، 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 - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

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

۳- مؤلف مسئول: PhD خون شناسی و بانک خون - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

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 سالپانه فرآورده‌های خونی را در کشور تشکیل می‌دهند (۳، ۲). آلوایمونیزاسیون برجسته‌ترین عارضه بالینی ناشی از تزریق خون مکرر در بیماران تالاسمی است، چرا که آلوایمونیزاسیون 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 (۴-۶). 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 (۷-۹، ۴). هم چنین تولید آلوآنتی‌بادی‌ها در بیماران مؤثنی که در سن باروری هستند می‌تواند فرآیند بارداری را در این بیماران با مشکل مواجه سازد (۱۰).

کلیدی‌ترین راه‌کار در کاهش میزان آلوایمونیزاسیون، 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 ایمونوژنیسته 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 آلوایمونیزاسیون 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 آلوآنتی‌بادی 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 (آل‌های K^{EL}*01 و K^{EL}*02) از سیستم گروه خونی Kell در بیماران تالاسمی دارای آلوآنتی‌بادی از طریق تجزیه و تحلیل مولکولی با روش‌های PCR-SSP، PCR- و RFLP و تعیین توالی DNA بررسی گردید.

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 (ایمونودیگنوستیکا) تعیین فنوتیپ شدند. ابتدا مطابق دستورالعمل شرکت سازنده، آنتی سرم 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 سالیین 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.

غریبالگری 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 μ L و شامل: ۱۲/۵ μ L 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 و 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 بیماران 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 محدودالثر Bsm I (Thermo scientific، US) انجام شد (جدول ۱). حجم کلی واکنش PCR، ۲۵ μ L و شامل: ۱۲/۵ μ L از Master Mix 2X PCR (یکتا تجهیز آزما، 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 و ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و 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

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

روش مولکولی	آنتی ژن	جلوبرنده/معکوس	توالی آغازگر	طول قطعه	منبع
PCR-SSP	K	جلوبرنده	ACTCATCAGAAGTCTCAGCA	۳۶۰ bp	(۲۲)
		معکوس	CTAGAGGGTGGGTCTTCTTCC		
	K	جلوبرنده	CTCATCAGAAGTCTCAGCG	۳۶۰ bp	
		معکوس	CCAAGGCCAAGTGTCAAGTGC		
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 و ۵۶ bp حاصل از برش آنزیم خواهیم بود.

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 ۱۰ دقیقه (جدول ۱). حجم کلی واکنش PCR، ۵۰ μ L و شامل: ۲۵ از Master Mix 2X PCR (ایران، یکتا تجهیز آزما)، غلظت ۲۰۰ ng DNA و آغازگر جلوبرنده و معکوس ۰/۰۲ میکرومولار بود. نتیجه تعیین توالی با برنامه کروماتس بررسی شد و با مشاهده موتاسیون و مکان‌یابی آن، نوع آلل در بیماران تعیین گردید.

یافته‌ها

مشخصات بیماران:

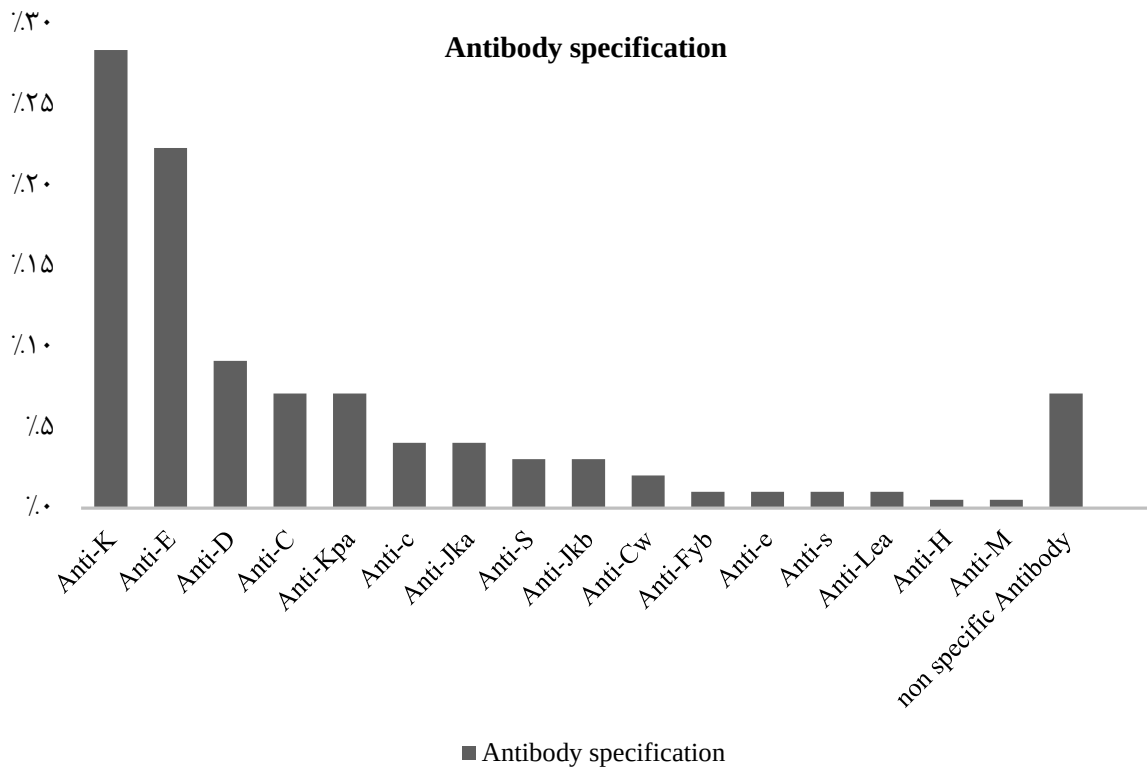
در این مطالعه ۲۰۰ بیمار تالاسمی دارای آلوانتی‌بادی شامل ۸۱ (۴۰/۵٪) بیمار مذکر و ۱۱۹ (۵۹/۵٪) بیمار مؤنث با میانگین سنی $10/9 \pm 30$ سال (رنج سنی ۴-۶۵ سال) مورد بررسی قرار گرفتند که از این بین ۱۰۸ (۵۴٪) بیمار تالاسمی ماژور، ۹۰ (۴۵٪) بیمار اینترمدیا و ۲ (۱٪) بیمار مبتلا به سیکل / بتاتالاسمی بودند.

نتایج مربوط به تعیین نوع آلوانتی‌بادی‌ها در جمعیت مورد بررسی:

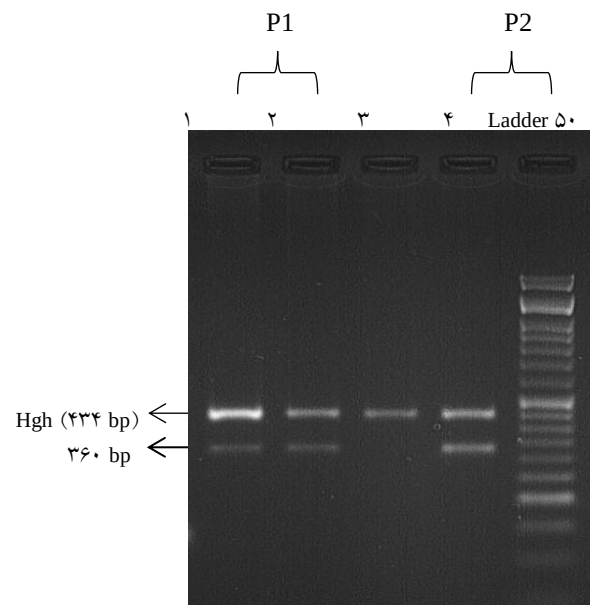
در این بررسی انواعی از آلوانتی‌بادی‌ها در سرم بیماران شناسایی گردید (نمودار ۱).

تعیین توالی DNA (DNA Sequencing):

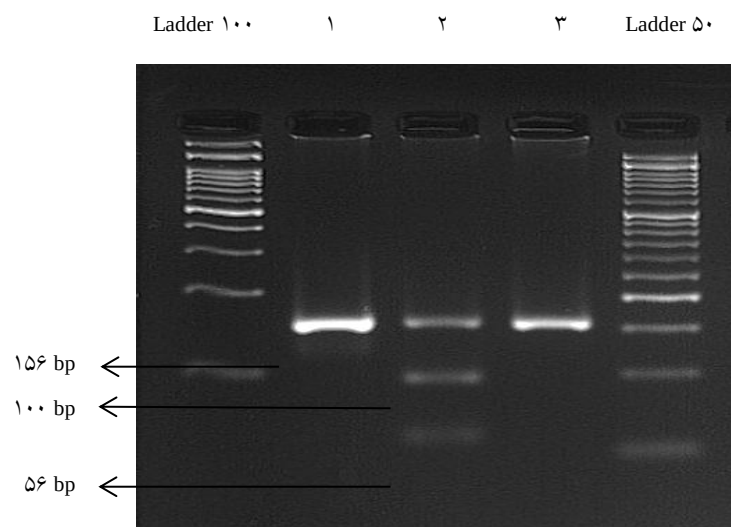
به منظور تایید آزمایش‌های مولکولی PCR-SSP و PCR-RFLP و تایید وجود موتاسیون در ناحیه مربوطه، در مواردی که در بین نتایج فنوتیپ و ژنوتیپ تناقض وجود داشت و هم چنین در ۵۰ نمونه به عنوان کنترل، اگزون شماره ۶ از لکوس ژنی Kell که حاوی SNP مرتبط با آنتی‌ژن‌های K و k می‌باشد تکثیر، و جهت تعیین توالی ارسال گردید. 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



نمودار ۱: درصد فراوانی آلوانتی بادی‌ها در بیماران مورد مطالعه



شکل ۱: 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 ۱ و 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.



شکل ۲: نمونه‌ای از نتایج PCR-RFLP در دو بیمار دارای ژنوتیپ $KEL*01/KEL*02$ و $KEL*02/KEL*02$: ستون ۱ باند اولیه حاصل از PCR را پیش از تاثیر آنزیم به طول ۱۵۶ bp 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-RFLP:

روش PCR-RFLP بر روی نمونه‌های دارای تناقض بین نتایج به دست آمده از روش‌های سروزیک 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 ۱۵۶ bp تحت تاثیر آنزیم به دو قطعه ۱۰۰ bp و ۵۶ bp برش داده شود. در افرادی که هر دو آلل را به صورت هتروزیگوت دارا می‌باشند، شاهد حضور هم‌زمان قطعات برش نخورده به طول ۱۵۶ bp و قطعات ۱۰۰ bp و ۵۶ bp حاصل از برش آنزیم خواهیم بود (شکل ۲).

نتایج مربوط به آزمایش مولکولی PCR-SSP:

از میان ۲۰۰ بیمار مورد بررسی ۹۶٪ 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 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

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

نتایج حاصل از مقایسه نتایج آزمایش های سرولوژی و روش مولکولی:

در بین نتایج به دست آمده از ژنوتیپ و روش های 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 آنتی بادی ها در این مطالعه نشان داد که شایع ترین آلوآنتی بادی ها در این بررسی به ترتیب شامل Anti-Kell (۲۸٪)، Anti-E (۲۲٪)، Anti-D (۹٪) و Anti-Kpa (۷٪) می باشند. 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 ژنوتیپ های 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. مطالعه های متعددی در ارتباط با شیوع آلوآنتی بادی ها در کشورهای مختلف اروپایی و آسیایی صورت گرفته

است که در غالب این مطالعه ها Anti-K و Anti-E فراوان ترین آنتی بادی ها هستند (۲۸-۲۵٪). در داخل کشور نیز مطالعه های بسیاری به صورت منطقه ای و یا چند مرکزی صورت گرفته است که در اغلب این مطالعه ها همانند نتایج به دست آمده در این تحقیق، Anti-K به عنوان فراوان ترین آنتی بادی در جمعیت بیماران تالاسمی شناخته شده است. در سال ۲۰۰۷ کریمی و همکاران در مطالعه ای میزان آلوایمیونیزاسیون را در جنوب ایران مورد مطالعه قرار دادند که در این بررسی شایع ترین آلوآنتی بادی ها به ترتیب (۵۰٪) Anti-Kell، (۱۵٪) Anti-D و (۱۰٪) Anti-E عنوان شد (۲۹). هم چنین در سال ۲۰۱۱ آذریکوان و همکاران در مطالعه ای چند مرکزی میزان آلوایمیونیزاسیون را مورد مطالعه قرار دادند که در این بررسی نیز Anti-K با ۳۳/۷٪ شایع ترین آنتی بادی 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 شایع ترین آلوآنتی بادی ها در بیماران تالاسمی این استان بودند (۳۱). تعدادی از مطالعه ها نیز شیوع بیشتر سایر آنتی بادی ها را گزارش نموده اند. 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 آلوآنتی بادی مربوط به (۸۸٪) Anti-D و سپس Anti-C و Anti-E بوده است (۳۲). هم چنین در مطالعه ای دیگر در سال ۲۰۱۳، میرزائیان و همکاران میزان آلوایمیونیزاسیون را در جنوب شرق ایران مورد بررسی قرار دادند که در این بررسی نیز آلوآنتی بادی های ضد آنتی ژن های سیستم Rh و سپس آنتی بادی های ضد آنتی ژن های سیستم گروه خونی Kell شایع ترین آلوآنتی بادی ها بودند (۳۳). اما به طور کلی می توان گفت در اغلب نقاط ایران آنتی بادی ضد آنتی ژن K شایع ترین آنتی بادی در بیماران تالاسمی می باشد و لذا ارزیابی دقیق این آنتی ژن و بررسی سازگاری آن پیش از تزریق خون در بیماران تالاسمی می تواند موارد آلوایمیونیزاسیون را در این بیماران کاهش داده و سبب بهبود فرآیندهای درمانی در این بیماران گردد.

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 آذریوان 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 $KEL*01/KEL*01$ 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

تشکر و قدردانی

از زحمات همکاران بخش ایمونوهماٹولوژی 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 مؤسسه تامین گردیده است.

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 آلوانتی‌بادی، ایفا کند.

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):

- 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, 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.
 - 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 Thalassemia patients [Thesis]. Malaysia: Universiti Sains Islam malaysia; 2016.

Original Article

Study of Kell blood group genotype in alloimmunized thalassemia patients

Sarihi R.¹, Amirizadeh N.¹, Oodi A.¹

¹Blood 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