

# خون

فصلنامه علمی پژوهشی

دوره ۴ شماره ۳ پاییز ۸۶ (۱۴۵-۱۷۴)

## فراوانی آنتیژن‌های پلاکتی در اهداکنندگان خون: مقایسه روش مولکولی (HPA-1a) با روش الیزا

طاهره مدنی<sup>۱</sup>، شهرام سمیعی<sup>۲</sup>، زهرا عطایی<sup>۳</sup>، مهناز کواری<sup>۳</sup>، دکتر غلامرضا بابایی<sup>۴</sup>، محبوبه مستخدمین<sup>۵</sup>، دکتر مژگان شایگان<sup>۶</sup>

### چکیده

#### سابقه و هدف

روش‌های سرولوژیکی جهت تعیین نوع آنتیژن‌های پلاکتی به دلیل محدودیت دسترسی به منابع آنتی‌سرم‌های اختصاصی و تعداد ناکافی پلاکت در بیماران مبتلا به ترمبوسیتوپنی محدود شده است. بنابراین از روش‌های مولکولی و بر پایه DNA جهت تعیین ژنوتیپ آنتیژن‌های پلاکتی استفاده می‌شود. از آن جا که در مورد میزان شیوع این آنتیژن‌ها در جمعیت ایران اطلاعات چندانی در دسترس نیست لذا هدف مطالعه، تعیین شیوع این آنتیژن‌ها در تعدادی از اهداکنندگان خون می‌باشد.

#### مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی بود. DNA از ۳ میلی‌لیتر خون کامل که از ۱۰۰ نفر اهداکننده خون، در لوله‌های حاوی EDTA جمع‌آوری شده بود، استخراج گردید. فراوانی آل‌های آنتیژن‌های پلاکتی HPA-1,2,3,4,5 و HPA-15 با استفاده از روش PCR-SSP مورد مطالعه قرار گرفتند. نمونه از این ۱۰۰ نفر نیز برای بررسی فنوتیپ به روش الیزا بررسی شدند. جهت بررسی فراوانی ژنی از معادله Hardy weinberg و تحلیل نتایج از آزمون‌های Z<sup>2</sup> و X<sup>2</sup> استفاده شد.

#### یافته‌ها

فراوانی ژنی آنتیژن‌های پلاکتی مورد بررسی به شرح زیر می‌باشد:

HPA-1a	(۰/۹۸)	HPA-1b	(۰/۰۲)	HPA-2a	(۰/۵۴)	HPA-3a	(۰/۴۶)	HPA-2b	(۰/۰۵)	HPA-3b	(۰/۵۲)
HPA-4a	(۱/۰)	HPA-5b	(۰/۹۹)	HPA-5a	(۰/۰۱)	HPA-15a	(۰/۴۷)	HPA-15b	(۰/۰۵۳)	HPA-1	(۰/۰۹)

در این مطالعه دیده نشد. فراوانی فنوتیپی زیر حاصل گردید:

HPA4b	۰	HPA5b/5b	٪۲	HPA1a/1a	٪۹۶	HPA1a/1b	٪۴	HPA2a/2a	٪۸	HPA2a/2b	٪۹۲	HPA3a/3a	٪۱۹
HPA15b/15b	٪۱۹	HPA3a/3b	٪۵۹	HPA3b/3b	٪۲۲	HPA4a/4a	٪۱۰۰	HPA5a/5a	٪۹۸	HPA15a/15a	٪۱۴	HPA15a/15b	٪۲۶
HPA1	۰	نمونه	٪۶۵	نمونه	٪۴۰	نمونه	٪۶۵	نمونه	٪۱۰	نمونه	٪۱۰	نمونه	٪۱۰

مثبت، ۴ نمونه (۱۰٪) منفی و ۱۰ نمونه HPA-1a بینایی شدند.

#### نتیجه‌گیری

در این مطالعه ژنوتیپ هموزیگوت HPA-1b/b به دست نیامد که مشابه سایر مطالعات انجام شده در آسیا می‌باشد. در این مطالعه با توجه به تفاوت‌های موجود در میزان فراوانی HPA-1,2,5 در مقایسه با سفیدپوستان اروپایی، به نظر می‌رسد احتمال تحریک تولید آنتی‌بادی ضد پلاکتی توسط این آنتیژن‌ها نیز متفاوت از نتایج سایر سفیدپوستان باشد که نیازمند بررسی‌های بیشتر در این زمینه است. به نظر می‌رسد HPA-5b و HPA-15b و HPA-2b ممکن است باعث پورپورای پس از تزریق و مقاومت پلاکتی شوند که این دو نقطه نظر نیازمند بررسی‌های بیشتر می‌باشند.

**کلمات کلیدی:** آنتیژن‌های پلاکتی، فراوانی ژنی، PCR، ایران

تاریخ دریافت: ۱۷/۵/۸۶

تاریخ پذیرش: ۲۳/۷/۸۶

۱- کارشناس ارشد خون شناسی و بانک خون - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

۲- کارشناس ارشد بیوپژیمی - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

۳- کارشناس بیولوژی - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

۴- کارشناس میکروبیولوژی - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

۵- آمار حیاتی - دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج PhD

۶- مؤلف مسؤول: PhD ایمنی شناسی - استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون - صندوق پستی ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵

آنـتـیـژـنـهـایـپـلاـكـتـیـمـیـشـودـ،ـدانـسـتـنـمـیـزـانـشـیـوـعـوـفـراـوـانـیـ آـنـتـیـژـنـهـایـپـلاـكـتـیـدرـهـرـجـمـعـیـتـوـمـنـطـقـهـجـغـرـافـیـابـیـلـازـمـ وـضـرـورـیـاسـتـ(ـ۱۱ـ،ـ۱۰ـ،ـ۴ـ).

غـربـالـگـرـیـ آـنـتـیـژـنـهـایـپـلاـكـتـیـ عـلـاوـهـ بـرـاهـمـیـتـدـرـافـرـادـ باـعـوـارـضـبـیـانـشـدـهـ،ـدـرـبـیـمـارـانـیـ کـهـدـرـخـطـرـبـرـوزـ تـرـمـبـوـسـیـتوـپـنـیـ وـخـوـنـرـیـزـیـ قـرـارـدارـنـدـنـیـزـضـرـورـیـمـیـبـاشـدـ.ـ لـذـاـدـرـاـینـمـطـالـعـهـبـاـتـوـجـهـبـهـعـدـمـگـزـارـشـهـایـقـبـلـیـدـرـ مـوـرـدـفـرـاـوـانـیـآـلـلـهـایـپـلاـكـتـیـدـرـاـیرـانـیـانـبـاـتـوـجـهـبـهـ تـوـانـایـهـایـمـوـجـوـدـ،ـتـلـاـشـشـدـکـهـضـمـنـرـاهـانـداـزـیـ روـشـ PCR-SSPـ بـهـبـرـرـسـیـ وـفـوـرـ آـنـتـیـژـنـهـایـپـلاـكـتـیـدـرـتـعـدـادـیـ اـزـاـهـدـاـكـنـدـگـانـخـونـ وـبـرـرـسـیـمـقـایـسـهـایـاـنـ روـشـدـرـ تعـیـینـ HPA-1aـ باـکـیـتـهـایـمـوـجـوـدـبـهـ روـشـالـیـزـاـ(ـELISAـ)ـ پـرـدـاـخـتـ.

### مواد و روش ها

مـطـالـعـهـ اـنـجـامـشـدـهـ اـزـنـوـعـتـوـصـيـفـیـبـودـ.ـنـمـوـنـهـهـایـخـونـ (ـ۳ـمـلـیـلـیـترـخـونـکـامـلـ)ـ اـزـ۱۰۰ـنـفـرـاـزـاـهـدـاـكـنـدـگـانـخـونـ مـرـاجـعـهـکـنـنـدـهـبـهـپـایـگـاهـاـنـتـقـالـخـونـتـهـرـانـدـرـلـولـهـهـایـ حـاوـیـضـدـاعـقـادـ جـمـعـآـورـیـ گـرـدـیدـ.ـنـمـوـنـهـگـیرـیـهـاـ بـهـصـورـتـتصـادـفـیـانـجـامـشـدـ.

برـایـ استـخـرـاجـ DNAـ اـزـ گـلـبـولـهـایـ سـفـیدـمـوـجـوـدـدـرـ باـفـیـکـوتـ وـکـیـاـنـ اـسـتـفـادـهـ گـرـدـیدـکـهـ دـارـایـسـتـوـنـ مـخـصـوصـمـیـبـاشـدـ.

برـایـ تعـیـینـ ژـنوـتـیـپـ ۱۵ـ اـزـ روـشـ HPA-1,2,3,4,5,15ـ PCR-SSPـ وـ طـبـقـ دـسـتـورـالـعـلـمـ مـتـكـالـفـ باـ کـمـیـ تـغـیـرـاتـ استـفـادـهـ گـرـدـیدـکـهـ درـ زـیـرـ شـرـحـ دـادـهـمـیـشـودـ(۱۲ـ).ـ ۱۲ـ لـولـهـ واـکـنـشـ جـدـاـگـانـهـ بـرـایـ تعـیـینـ ژـنوـتـیـپـ ۱۲ـ آـلـلـ مـوـرـ نـظـرـ(ـHPA-1a,1b,2a,2b,3a,3b,4a,4b,5a,5b,15a,15bـ)ـ اـسـتـفـادـهـشـدـ.ـ تـوـالـیـ آـغـازـگـرـهـاـ درـ جـدـولـ ۱ـ آـمـدـهـ استـ.ـ آـغـازـگـرـهـاـ بـهـصـورـتـ دـسـتـسـازـ درـ آـزـمـاـشـگـاهـ کـیـتـسـازـیـ مرـکـزـ تـحـقـيقـاتـ سـازـمانـ اـنـتـقـالـخـونـ اـیـرانـ تـهـبـیـهـشـدـنـ.ـ حـجمـ کـلـیـ مـحـتـوـایـ واـکـنـشـ ۱۰ـ مـیـکـرـولـیـترـ وـشـامـلـ ۲ـ مـیـکـرـولـیـترـ نـمـوـنـهـ DNAـ،ـ ۳ـ مـیـکـرـولـیـترـ اـزـ مـخـلـوطـ واـکـنـشـ وـ ۵ـ مـیـکـرـولـیـترـ اـزـ مـخـلـوطـ آـغـازـگـرـهـاـ درـهـرـلـولـهـبـودـ.ـ مـخـلـوطـ آـغـازـگـرـهـاـشـامـلـ آـغـازـگـرـمـخـصـوصـآـلـلـ(ـallele specific primerـ)،ـ آـغـازـگـرـمـشـتـرـکـدوـآـلـلـ(ـcommon primerـ)،ـ

گـلـیـکـوـپـروـتـئـینـهـایـغـشـاءـپـلاـكـتـیـ،ـشـاخـصـهـایـآـنـتـیـژـنـیـ پـلـیـمـورـفـیـکـ رـاـدـرـسـطـخـ خـودـبـیـانـمـیـکـنـنـدـ(۱ـ).ـ آـنـتـیـژـنـهـایـپـلاـكـتـیـ(ـHPAsـ)ـ درـصـورـتـیـ کـهـمـوـجـبـسـاختـهـشـدـ آـنـتـیـبـادـیـ گـرـدـنـدـ،ـبـاعـثـبـرـوزـعـوـارـضـنـاـشـیـ اـزـ تـرـمـبـوـسـیـتوـپـنـیـ وـخـوـنـرـیـزـیـمـیـشـوـنـدـ.ـ ۵ـ عـارـضـهـدـرـاـیـنـ حـالـ قـابـلـتـشـخـیـصـاـستـ:ـ(۱ـ)ـ تـرـمـبـوـسـیـتوـپـنـیـآـلـوـایـمـیـوـنـ نـوـزـادـانـ،ـ(۲ـ)ـ پـوـرـپـورـایـپـسـاـزـتـرـیـقـ،ـ(۳ـ)ـمـقاـومـتـپـلاـكـتـیـ،ـ (۴ـ)ـ تـرـمـبـوـسـیـتوـپـنـیـآـلـوـایـمـیـوـنـغـیرـفـعـالـ وـ(۵ـ)ـ تـرـمـبـوـسـیـتوـپـنـیـآـلـوـایـمـیـوـنـ بـعـدـاـزـپـیـونـدـ(۲ـ).ـ درـعـیـنـحـالـاـزـآـنـجـاـکـهـ HPAsـ جـزوـ آـنـتـیـژـنـهـایـسـازـگـارـیـ نـسـجـیـ فـرعـیـ هـسـتـنـدـ،ـدـرـ بـرـوزـGVHDـ حـادـپـسـاـزـبـیـونـدـسـلـولـهـایـبـنـیـادـیـخـونـسـازـ نـیـزـدـخـالـتـدـارـنـدـ(۳ـ).

مـیـزـانـبـرـوزـNAITPـ(ـ)ـ (ـNeonatal Idiopathic Thrombocytopenia Porpuraـ)ـ درـحدـودـیـکـمـوـرـدـدـرـ هـزـارـزـایـمـانـ زـنـدـهـ اـسـتـدـرـحـالـیـ کـهـمـوـرـدـگـزـارـشـشـدـ بـرـایـ PTPـ(ـPost Thrombocitopenic Porpuraـ)ـ مـوـرـدـبـودـهـ استـ(۴ـ).

تشـخـیـصـآـلـوـآـنـتـیـژـنـهـایـپـلاـكـتـیـ تـاـدـهـ ۱۹۸۰ـ باـ استـفادـهـ اـزـ سـرـمـهـایـ اـنـسـانـیـ حـاوـیـآـلـوـآـنـتـیـبـادـیـهـاـ صـورـتـمـیـگـرفـتـ وـلـیـ بـهـ دـلـیـلـدـرـ دـسـتـرسـ نـبـودـ آـنـتـیـسـرـمـهـاـدـرـهـمـهـمـراـکـزـ وـ مشـکـلـبـودـنـتـهـیـهـتـعـدـادـکـافـیـپـلاـکـتـلـازـمـاـزـبـیـمـارـانـمـبـتـلاـ بـهـ تـرـمـبـوـسـیـتوـپـنـیـ،ـجـهـتـبـرـرـسـیـآـنـهـاـ روـشـهـایـمـوـلـکـولـیـ اـرـجـحـیـتـدـارـنـدـ(۵ـ).ـ بـرـرـسـیـHPA-1aـ بـهـ روـشـالـیـزـاـ وـ روـشـهـایـمـبـنـنـیـبـرـDNAـ نـظـیرـهـیـرـیدـاـسـیـوـنـAllele Specific Oligonucleotide Hybridizationـ،ـ بـرـرـسـیـپـلـیـمـورـفـیـسـمـ قـطـعـاتـمـحـدـودـ طـولـیـ(ـRestriction Fragment Lengthـ)،ـ بـاـ استـفادـهـ اـزـ آـنـزـیـمـهـایـ Polymorphism Analysisـ مـحـدـودـکـنـنـدـهـ وـ PCR-SSPـ(ـPolymerase Chain Reaction Sequence Specific Primersـ)ـ نـیـزـاـزـدـیـگـرـ رـوـشـهـایـبـرـرـسـیـ اـنـتـیـژـنـهـایـمـیـبـاشـنـدـکـهـ اـزـمـیـانـآـنـهـاـ PCR-SSPـبـیـشـتـرـینـ وـ سـادـهـتـرـینـ کـارـبـردـ رـاـ دـارـدـ(۶ـ،ـ۷ـ،ـ۸ـ).

باـ تـوـجـهـبـهـ اـيـنـ کـهـ فـرـاـوـانـیـآـلـوـآـنـتـیـژـنـهـایـپـلاـكـتـیـ درـجـمـعـیـتـهـایـمـخـلـوطـمـتـفـاـوتـمـیـبـاشـدـ وـ اـيـنـ مـسـالـهـ باـعـثـ تـفـاـوتـدـرـمـیـزـانـآـلـوـایـمـیـوـنـیـزـاسـیـوـنـ اـفـرـادـنـسبـتـبـهـ

جدول ۱: توالی آغازگرها، اندازه، غلظت نهایی و اندازه مورد انتظار برای محصولات تکثیری در هر آنتیژن

سیستم	آنتیژن	اندازه (bp)	غلهٔ نهایی (μM)	توالی	اندازه (bp)
HPA-1	1a	۱۹			
	1b	۱۹	۰/۳۵	۵' TCACAGCGAGGTGAGGCCA ۳'	
	Common	۲۱		۵' TCACAGCGAGGTGAGGCCG ۳' ۵' GGAGGTAGAGAGTCGCCATAG ۳'	۹۰
HPA-2	2a	۱۸			
	2b	۱۸	۰/۳۵	۵' GCCCCCAGGGCTCCTGAC ۳'	
	Common	۲۰		۵' GCCCCCAGGGCTCCTGAT ۳' ۵' TCAGCATTGTCCTGCAGCCA ۳'	۲۵۸
HPA-3	3a	۱۹			
	3b	۱۹	۰/۵	۵' TGGACTGGGCTGCCAT ۳'	
	Common	۲۱		۵' TGGACTGGGCTGCCAG ۳' ۵' TCCATGTTCACTTGAAGTGCT ۳'	۲۶۷
HPA-4	4a	۱۸			
	4b	۱۸	۰/۳۵	۵' GCTGGCCACCCAGTGCG ۳'	
	Common	۱۹		۵' GCTGGCCACCCAGTGCA ۳' ۵' CAGGGGTTTCGAGGGCT ۳'	۱۲۰
HPA-5	5a	۲۳			
	5b	۲۳	۰/۵	۵' AGAGTCTACCTGTTACTATCAAAG ۳'	
	common	۲۱		۵' AGAGTCTACCTGTTACTATCAAAA ۳' ۵' CTCTCATGGAAAATGGCAGTACA ۳'	۲۴۶
HPA-15	15a	۲۳			
	15b	۲۳	۰/۵	۵' TTCAAATTCTGGTAAATCCTCG ۳'	
	Commom	۲۲		۵' TTCAAATTCTGGTAAATCCTCT ۳' ۵' ATGAACCTTATGATGACCTATTTC ۳'	۲۲۵
HGH	پیش‌برنده	۲۱	۰/۲	۵' GCCTTCCCAACCATTCCCTTA ۳'	
	معکوس	۲۲		۵' TCACGGATTCTGTTGTGTTTC ۳'	۴۲۹

ثانیه، ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه  
۲۰ سیکل: ۹۶ °C به مدت ۲۵ ثانیه، ۶۱ °C به مدت ۴۵  
ثانیه، ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه  
۱۵ سیکل: ۹۶ °C به مدت ۲۵ ثانیه، ۵۱ °C به مدت ۶۰  
ثانیه، ۷۲ °C به مدت ۱۲۰ ثانیه  
۱ سیکل: ۴ °C به مدت ۳ دقیقه  
پس از انجام مراحل تکثیر، محصولات PCR روی ژل  
آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شده و با استفاده از رنگ‌آمیزی  
اتیدیوم بروماید و ترانس ایلومناتور UV مشاهده و بررسی  
شدند. اندازه مورد انتظار برای هر آلل در جدول ۱ نشان  
داده شده است.

بر روی ۴۰ نمونه HPA-1a (با توجه به تاخیر در  
دریافت کیت الیزا و محدودیت زمانی مطالعه فقط ۴۰

یک جفت آغازگر HGH (کترسل مثبت واکنش PCR) و  
dH<sub>2</sub>O بود که مقدار مصرفی هر کدام بسته به غلظت نهایی  
مورد نظر برای آن آغازگر داشت. مقدار آنزیم برای هر  
واکنش ۰/۳ میکرولیتر بود که به صورت کلی برای هر  
دوره واکنش محاسبه گردید و در مخلوط واکنش اضافه  
شد. مخلوط واکنش شامل: ۱ میکرولیتر بافر، ۰/۲  
میکرولیتر dNTPs، ۰/۶ میکرولیتر MgCl<sub>2</sub> و ۱/۲  
میکرولیتر dH<sub>2</sub>O برای هر لوله واکنش می‌باشد. غلظت  
نهایی MgCl<sub>2</sub> در همه واکنش‌ها ۱/۵ میکرومولار در نظر  
گرفته شد. پس از ۱۵ دقیقه انکوپاسیون در دمای ۹۵ °C،  
مراحل PCR به صورت زیر انجام شد.

۱ سیکل: ۹۶ °C به مدت ۶۰ ثانیه  
۵ سیکل: ۹۶ °C به مدت ۲۵ ثانیه، ۶۱ °C به مدت ۴۵

جدول ۲: فراوانی ژنی آل‌های آنتیژن‌های پلاکتی در جمعیت  
مورد مطالعه

HPA سیستم	فراوانی ژنی
1a	۰/۹۸
1b	۰/۰۲
2a	۰/۵۴
2b	۰/۴۶
3a	۰/۴۸
3b	۰/۵۲
4a	۱
4b	۰
5a	۰/۹۹
5b	۰/۰۱
15a	۰/۴۷
15b	۰/۵۳

HPA-4b اصلاً مشاهده نشد. فراوانی آنتیژن‌های پلاکتی در جدول ۲ نشان داده شده است. فراوانی فنوتیپی آنتیژن‌های پلاکتی نشان می‌دهد که بیشترین میزان هموزیگوستی مربوط به HPA-4a/4a (٪/۹۶)، HPA-5a/5a (٪/۱۰۰)، HPA-1a/1a (٪/۹۲) و HPA-2a/2b (٪/۶۷) بوده‌اند که نسبت به اشکال اشکال هموزیگوت HPA-1b/1b، HPA-2b/2b، HPA-5b/5b، HPA-4b/4b مشاهده نمی‌شوند. فراوانی فرم هتروزیگوت در مورد HPA-3a/b (٪/۵۹) و در مورد HPA-15a/b (٪/۱۵) بوده‌اند که نسبت به اشکال هموزیگوت همین آنتیژن‌ها (a/a و b/b) سهم بیشتری را دارا می‌باشند. فراوانی فنوتیپی به دست آمده برای آنتیژن‌های پلاکتی مورد مطالعه در جدول ۳ نشان داده شده است. جهت حذف تداخل باندهای غیر اختصاصی با باند اصلی مربوط به آل‌های HPA-3a,3b و تمایز بهتر آن‌ها، تغییراتی در شرایط تکثیر این دو آل نسبت به روش دکتر متکalf داده شده است (۱۳، ۱۴). نتایج تقویت ژنوم و الکتروفورز محصولات PCR در شکل ۱ نشان داده شده‌اند.

نمونه برای بررسی HPA-1a به روش الیزا مورد استفاده قرار گرفتند) علاوه بر روش PCR-SSP با استفاده از کیت الیزا (دیامد) بررسی فنوتیپی نیز صورت گرفت. به طور خلاصه نمونه‌های خون کامل در ماده ضد انعقاد EDTA پس از انتقال به آزمایشگاه به صورت دوتایی و با حجم ۱۰۰ میکرولیتر به حفرات U شکل پوشیده با آنتی‌بادی ضد HPA-1a اضافه و به مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه انکوبه شدنکو به شدند.

سپس ۳ مرتبه مراحل شستشو انجام گرفت و ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌هیومون کثروگه با پراکسیداز به هر حفره اضافه شد. به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شدنند و سپس مراحل شستشو انجام گرفت. ۵۰ میکرولیتر از ترا متیل بنزیدین (TMB) به عنوان سوبسترا به آن افزوده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه و تاریکی انکوبه گردید. سپس جذب نوری در ۶۳۰ نانومتر (برای مرجع) و ۴۵۰ نانومتر (برای نمونه مورد بررسی) قرائت شد.

جذب نوری کمتر از ۰/۳ منفی، بیش از ۰/۵ مثبت و در بین دو محدوده به صورت بینابینی گزارش شدند. در هر نوبت کاری نمونه مثبت و منفی موجود در کیت مورد استفاده قرار گرفتند.

برای تعیین فراوانی ژنی از معادله Hardy Weinberg مقایسه فراوانی بین جمعیت‌های مختلف از آزمون مقایسه نسبت‌ها (آزمون Z)، مقایسه نتایج دو روش مولکولی و الیزا و بررسی فراوانی HPA-1a از آزمون همبستگی  $\chi^2$  استفاده شده است.

### یافته‌ها

جمعأً ۱۰۰ نفر از اهداکنندگان خون مراجعه کننده به پایگاه انتقال خون تهران در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند که از این تعداد ۸۰٪ مرد و ۲۰٪ زن در محدوده سنی ۲۰ تا ۷۰ سال و با میانگین سنی  $40 \pm 10$  سال بودند. آل‌های آنتیژن‌های پلاکتی نشان می‌دهند که HPA-5a، HPA-4a، HPA-2a، HPA-1a و HPA-3b در تمام افراد دیده شده‌اند (٪/۱۰۰). در حالی که وفور HPA-1b (٪/۴) HPA-3a (٪/۷۸) HPA-2b (٪/۸۲) HPA-15b (٪/۸۱) HPA-15a (٪/۱) HPA-15b (٪/۸۶) بوده

جدول ۳: مقایسه فراوانی ژنی آلل های آنتی ژن های پلاکتی در جمعیت ایران با نتایج دیگر مطالعات

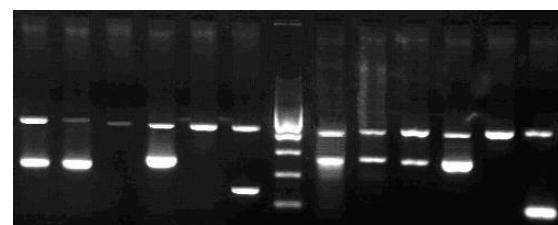
جمعیت(تعداد)	HPA-1 Alleles		HPA-2 Alleles		HPA-3 Alleles		HPA-4 Alleles		HPA-5 Alleles		HPA-15 Alleles		منابع
	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5a	5b	15a	15b	
آلمان (N=۹۸)	۰/۸۵	۰/۱۵	۰/۹۳	۰/۰۷	۰/۰۵	۰/۴۵	۱/۰	۰/۰	۰/۹۰	۰/۱۰	-	-	Simese <i>et al.</i> (۱۹۹۳)
اتریش (N=۹۰۰)	۰/۸۵	۰/۱۵	۰/۹۲	۰/۰۸	۰/۸۱	۰/۳۹	-	-	۰/۸۹	۰/۱۱	-	-	Holensteiner <i>et al.</i> (۱۹۹۵)
فنلاند (N=۲۰۰)	۰/۸۶	۰/۱۴	۰/۹۱	۰/۰۹	۰/۰۹	۰/۴۵	-	-	۰/۹۵	۰/۰۵	-	-	Kekomaki <i>et al.</i> (۱۹۹۵)
آفریقایی - آمازونی (N=۱۰۰)	۰/۹۲	۰/۰۸	۰/۸۲	۰/۱۸	۰/۸۳	۰/۳۵	۱/۰	۰/۰	۰/۷۹	-	-	-	Kim <i>et al.</i> (۱۹۹۵)
ژاپن (N=۳۳۱)	۰/۹۹	۰/۰۱	۰/۸۷	۰/۱۲	۰/۰۵	۰/۴۵	۰/۹۹	۰/۰۱	۰/۹۰۴	۰/۰۴۶	-	-	Tanaka <i>et al.</i> (۱۹۹۶)
اسپانیا* (N=۵۰۰)	۰/۸۱	۰/۱۹	۰/۹۰	۰/۱۰	۰/۶۵	۰/۳۳	۱/۰	۰/۰	۰/۸۸	۰/۱۲	-	-	Muniz-Diaz <i>et al.</i> (۱۹۹۸)
کره (N=۲۰۰)	۰/۹۹	۰/۰۱	۰/۹۲	۰/۰۸	۰/۰۵	۰/۲۹	۰/۹۹	۰/۰۱	۰/۹۸	۰/۰۲	-	-	Seo <i>et al.</i> (۱۹۹۸)
سفید بستان آمریکا	۰/۸۹	۰/۱۱	۰/۹۲	۰/۰۹	۰/۶۷	۰/۰۵	۱/۰	۰/۰	۰/۸۹	۰/۱۱	-	-	Drzewek <i>et al.</i> (۱۹۹۸)
سرخپستان آمریکا (N=۹۵)	۱/۰	۰/۰	۰/۹۶	۰/۰۴	۰/۷۱	۰/۳۲	۱/۰	۰/۰	۰/۹۶	۰/۰۴	-	-	Chiba <i>et al.</i> (۲۰۰۰)
عربستان سعودی (N=۸۴)	۱/۰	۰/۰	۰/۹۶	۰/۰۴	۰/۹۵	۰/۲۷	۰/۹۸	۰/۰۲	۰/۹۷	۰/۰۳	-	-	Al-Sheikh <i>et al.</i> (۲۰۰۰)
بربریها (N=۱۱۰)	۰/۷۵	۰/۲۵	۰/۸۲	۰/۱۸	۰/۶۸	-	۱/۰	۰/۰	۰/۸۶	۰/۱۴	-	-	Ferrer <i>et al.</i> (۲۰۰۲)
انگلستان (N=۱۳۴)	۰/۸۴	۰/۱۶	۰/۹۲	۰/۰۷	۰/۸۲	-	۱/۰	۰/۰	۰/۹۱	۰/۰۸	-	-	Jones <i>et al.</i> (۲۰۰۳)
تایلند (N=۱۳۷)	-	-	-	-	-	۰/۴۱	-	-	-	-	۰/۴۸	۰/۰۲	Shih <i>et al.</i> (۲۰۰۳)
برزیل (N=۱۳۷)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۰/۰۱	۰/۴۹	Cardone <i>et al.</i> (۲۰۰۴)
چین (N=۱۰۰۰)	۰/۹۹	۰/۰۱	۰/۹۵	۰/۰۵	۰/۰۹	۰/۴۳	۰/۹۹	۰/۰۱	۰/۹۸	۰/۰۲	۰/۰۴	۰/۴۹	Feng <i>et al.</i> (۲۰۰۶)(۱۵)
کرواسی (N=۲۷۹)	-	-	-	-	-	۰/۰۲	-	-	-	-	۰/۰۳	۰/۴۷	Tomicic <i>et al.</i> (۲۰۰۸)(۱۶)
بحرين (N=۱۹۴)	۰/۷۵	۰/۲۵	۰/۷۷	۰/۳۳	۰/۰۷	-	۰/۹۳	۰/۰۷	۰/۸۶	۰/۱۴	-	-	Al-Subaie <i>et al.</i> (۲۰۰۷)(۱۷)
ایران (N=۱۰۰)	۰/۹۸	۰/۰۲	۰/۰۴	۰/۴۶	۰/۴۸	-	۱/۰	۰/۰	۰/۹۹	۰/۰۱	۰/۴۷	۰/۰۳	مطالعه حاضر

\* فقط یکصد نفر از افراد برای HPA-5a مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج این مطالعه با دیگر مطالعات، بیشترین میزان تفاوت در وفور آلل های HPA-2a (۰/۵۴) و HPA-2b (۰/۴۶) در مشاهده شده است در حالی که در نتایج اعلام شده در سایر مطالعات برای HPA-2a در محدوده ۰/۹۶-۰/۸۲ و برای HPA-2b در محدوده ۰/۱۸-۰/۰۴ ذکر گردیده اند. وفور آلل های HPA-3a, -3b (۰/۵۲)، HPA-4a (۰/۴۸) و HPA-15a, -15b (۰/۵۳، ۰/۴۷) م را باشند.

در مقایسه نتایج مطالعه حاضر با سایر مطالعات مشخص گردید که فراوانی HPA-1a,-1b در این مطالعه با نتایج به دست آمده در عربستان سعودی (۱۰، چین (۰/۹۹۴، ۰/۹۹)، کره (۰/۰۱، ۰/۹۹)، هند و آمازون (۱، ۰) بدون اختلاف معنی دار و با نتایج مطالعات انجام شده در آلمان، اتریش، فنلاند، اسپانیا، سفیدپستان آمریکا و انگلیس با اختلاف معنی دار می باشد  $p < 0/05$ . هم چنین این مقایسه نشان می دهد در مورد فراوانی HPA-1a,-1b نتایج ما بیشتر شبیه نتایج به دست آمده در مطالعات آسیایی است. میزان شیوع HPA-2a,-2b در ایران متفاوت از سایر جمیعت ها بوده و با همه نتایج گزارش شده دارای اختلاف معنی دار است  $p < 0/05$ . مقایسه وفور HPA-3a,-3b ( $0/052$ ،  $0/48$ ) در جمیعت ها مانند اتریش ( $0/39$ ،  $0/61$ )، اسپانیا ( $0/35$ ،  $0/65$ ) و فنلاند ( $0/41$ ،  $0/59$ ) دارای اختلاف معنی دار می باشد  $p < 0/01$ . در مطالعه ما وفور HPA-3b بیشتر از HPA-3a به دست آمده است. گزارش های مشابهی در مطالعه کوکل کیرینی در هند و سانتوز در اندونزی نیز وجود دارد که در آنها وفور HPA-3b به ترتیب  $1/0$  و  $0/53$  بوده و از فراوانی HPA-3a به ترتیب  $0/0$  و  $0/46$  بیشتر م باشند (۲۰، ۲۳).

فراؤانی HPA-4a,-4b (۰/۰، ۱/۰) در مطالعه ما بیشتر شبیه نتایج به دست آمده برای این آلل‌ها در مطالعات اروپایی (اسپانیا، آلمان، انگلستان) و سفیدپستان آمریکایی (۰/۰، ۱/۰) می‌باشد در حالی که در مطالعات آسیایی، مانند چین (۰/۰۶، ۰/۹۹۴)، کره و عربستان



شکل ۱: ژنوتیپ PCR-SSP HPA-1-HPA-5, HPA-15 با روش از سمت راست به چهار HPA-2b, HPA-2a, HPA-1b, HPA-1a: HPA- HPA-4a، (100 bp Size marker)، HPA-3b, HPA-3a ۱۵b, HPA-15a, HPA-5b, HPA-5a، 4b ۱۵a، HPA-1b/1a, 2a/2b, 3a/3b, 4a/4a, 5a/5a, 15a/15b ۱۵b می باشد.

نتایج روش الیزا نشان داد از ۴۰ نمونه HPA-1a مورد بررسی به هر دو روش که همگی به روش PCR-SSP مثبت بودند، ۲۶ نمونه(۶۵٪) به روش الیزا، مثبت شدند که همگی هموژیگوت(HPA-1a/1a) بودند. ۴ نمونه(۱۰٪) به روش الیزا منفی شدند که همگی هموژیگوت(HPA-1a/1a) بوده و از ۱۰ مورد دیگری بینایی، ۴ مورد هتروژیگوت(HPA-1a/1b) و مابقی هموژیگوت بودند.

حساسیت روش ۸۷٪ و به علت فقدان نمونه منفی برای HPA-1a اختصاصیت آن قابل محسوبه نبود. بررسی آماری این دو روش با آزمون  $\chi^2$  نشان داد اختلاف بین دو روش معنی دار نیست و چنانچه موارد مشکوک حذف و مجدداً بررسی آماری شوند، اختلاف بین دو روش باز هم معنی دار نمی باشد.

بخت

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد بیشترین میزان فراوانی ژنی مربوط به HPA-1a (۰/۹۸)، HPA-4a (۰/۹۰) و HPA-5a (۰/۹۹) می‌باشد. فراوانی اعلام شده برای این آلل‌ها در سایر مطالعات به ترتیب در محدوده (۰/۷۵-۱)، (۰/۹۸-۱)، (۰/۹۸-۰) و (۰/۹۹-۰) می‌باشدند. از سوی دیگر کمترین فراوانی‌ها و مربوط به HPA-1b (۰/۰۲)، HPA-4b (۰/۰) و HPA-5b (۰/۰۱) است که فراوانی‌های به دست آمده برای هر کدام در دیگر مطالعات به ترتیب در محدوده (۰/۲۵-۰)، (۰/۰۴-۰) و (۰/۰۴-۰) گزارش شده‌اند. در مقایسه

می باشدند(۲۴). لذا علی رغم وجود مشترکات قومی و نژادی آنان با ایرانیان، به نظر می رسد عدم حضور نمونه ای از زرتشیان در مطالعه حاضر و اختلاط قومی موجود در ایرانیان، توجیه کننده احتمالی این اختلاف باشد.

در این مطالعه اشکال هموزیگوت b/b برای آلل های HPA-1/2/4 مشاهده نشد که مشابه مطالعه سن و همکاران برای آلل های HPA-1/2/5/6 بر روی ۱۴۸ اهداکننده خون در چین و مطالعه فرر و همکاران برای آلل های HPA-4/6 بر روی بربرهای مراکشی است(۱۴، ۱۵).

تعیین ژنتیپ آنتیزن های پلاکتی در تشخیص سندروم های ترمبوستیوپنیک الولایمیون، روند درمان صحیح جهت بیماران دارای آنتی بادی های پلاکتی، مشاوره ژنتیک جهت پیشگیری از NAITP و مطالعات نژادی اهمیت دارد. روش های سرولوژیک مانند روش های ایمونوفلورسنت، MAIPA و روش های تغییر یافته الیزا، همه نیاز به آنتی سرم های مخصوص علیه آنتیزن های تحت مطالعه دارند.

در مطالعه حاضر از روش PCR-SSP طبق طراحی دکتر متکalf برای تعیین ژنتیپ آنتیزن های پلاکتی استفاده شده که طبق شرایط آزمایشگاهی موجود تغییراتی نیز در آن اعمال شده است. باندهای غیر اختصاصی در بررسی HPA-3a,-3b همانند بعضی دیگر از مطالعات علی رغم تغییرات مختلفی که در روند تکثیر انجام گرفت، مشاهده شدند اما در تشخیص نهایی باندها خلی ایجاد نشد(۱۳، ۱۴). تغییرات اعمال شده شامل: ایجاد گرادیان حرارتی در مرحله جفت شدن آغازگرها با آلل مربوطه (Annealing)، کاهش غلاظت DNA، MgCl<sub>2</sub> و مخلوط آغازگری (Primer Mix)، استفاده از بافر آلومینیوم سولفات، گلیسرول، بتایین و DMSO در تهیه مخلوط واکنش (Master Mix) و کاهش تکرارها در سیکل سوم و افزایش آنها در سیکل چهارم می باشدند. در بعضی از مطالعات، استفاده از روش PCR-RFLP جهت تکثیر و بررسی HPA-3a,-3b پیشنهاد شده است تا از تداخل باندهای غیر اختصاصی در تفسیر نتایج این دو آلل جلوگیری شود و به نظر می رسد که با این روش نتایج حاصل از بررسی فراآنی HPA-3a,-3b به دلیل عدم

سعودی(۰/۰، ۹۸/۰۲)، گزارش هایی از شیوع HPA-4b اعلام شده است و احتمال حضور آنتی بادی های ضد HPA-4b در این جمعیت ها وجود دارد(۲۰، ۲۲، ۲۰). عدم حضور آلل HPA-4b در جمعیت ما مشابه نتایج گزارش شده در مطالعات اروپا و آمریکا است و با وفور چند درصدی(۰/۰۰۶-۰/۰۰۲) این آلل در جمعیت آسیایی دارای اختلاف آماری معنی دار می باشد(۰/۰۵)(p<).

مقایسه وفور آلل های HPA-5 با فراآنی HPA-5a,-5b با فراآنی آن در عربستان سعودی(۰/۰۳ و ۰/۹۷)، بدون اختلاف معنی دار و با فراآنی آن در سایر جمعیت ها با اختلاف معنی دار است(۰/۰۱)(p<۰/۱۹، ۱۸، ۱۱).

از آن جا که اساس مولکولی HPA-15a,-15b در سال ۲۰۰۲ کشف شد، فراآنی این آنتیزن در سال های اخیر و به طور جداگانه در بعضی از جوامع بررسی شده است. HPA-15a,-15b بررسی نتایج حاصل نشان می دهد فراآنی HPA-15a,-15b در جمعیت ما در مقایسه با برزیل(۰/۰۵۱)، تایلند(۰/۰۵۲)، چین(۰/۰۴۶)، و اسکاتلند(۰/۰۴۷)، در یک محدوده بوده و بدون اختلاف معنی دار است. به علاوه در مطالعه ما فراآنی HPA-15a کمتر از فراآنی HPA-15b بوده که قبل از مطالعات تایلند(۰/۰۵۲) و کانادا(۰/۰۵۳ و ۰/۰۴۷) نیز گزارش شده است(۵).

در مطالعه ای که بر روی آنتیزن های پلاکتی در جمعیت پارسیان هند صورت گرفته، فراآنی فنوتیپی آنتیزن ها (هموزیگوت و هتروزیگوت) گزارش شدند که در مقایسه با نتایج مطالعه حاضر اختلافات معنی داری در فراآنی آنتیزن های پلاکتی HPA-1,-2,-3,-5 در این دو جمعیت وجود دارند(۰/۰۵)(p<). تنها موارد مشابه میزان فراآنی فنوتیپی HPA-1b/1b، HPA-4a/4a و عدم حضور HPA-4b/4b، HPA-2b/2b، HPA-5b در هر دو مطالعه می باشند که بدون اختلاف معنی دار هستند. عدم حضور HPA-3a در فراآنی HPA-3b در جمعیت پارسیان هند، قابل توجه درصدی HAP-3b در جمعیت پارسیان هند، قابل توجه می باشد. پارسیان هند زرتشیان ایرانی هستند که ۱۳۰۰ سال پیش به هند مهاجرت کرده اند و به علت عدم اختلاط با سایر قومیت ها در هند ظاهرآً فاقد تداخل های ژنتیکی

غربالگری اهداکنندگان و پیدا کردن افراد HPA-1a منفی می‌باشد. به علت عدم وجود نمونه منفی برای HPA-1a امکان مقایسه دقیق نتایج ما وجود ندارد.

### نتیجه‌گیری

به طور کلی با توجه به شباهت‌ها و تفاوت‌هایی که بین وفور برخی آلل‌ها در این مطالعه و سایر مطالعات پیدا شد نمی‌توان جمعیتی را پیدا کرد که نتایج این مطالعه با آن به طور کامل یکسان یا مشابه باشد. که ممکن است به تفاوت‌های نژادی مربوط باشد. با توجه به وفور HPA-1b/2b/5b در این مطالعه به نظر می‌رسد این آنتیژن مسؤول آلایمونیزاسیون پس از انتقال خون باشد اما برای تعیین دقیق این امر و تعیین چگونگی وضعیت حضور آنتی‌بادی‌های ضد آنتیژن‌های پلاکتی در جامعه مالازم است پس از بررسی ژنوتیپ بیماران از نظر آنتیژن‌های پلاکتی، با استفاده از روش‌های سروولوژیکی مانند MAIPA حضور آنتی‌بادی‌های پلاکتی در این افراد ایمونیزه بررسی شوند تا علل اصلی و عمدۀ عوارض ناشی از تزریق پلاکت به دلیل حضور آنتی‌بادی‌های ضد آنتیژن‌های مخصوص پلاکتی در جامعه ما مشخص گرددند.

### تشکر و قدردانی

هزینه‌های این مطالعه توسط مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران تأمین شده است. نویسنده‌گان مقاله از دکتر مصطفی جمالی و خانم‌ها دکتر زهره عطارچی و دکتر شهناز وال محمدی که امکان تهیه نمونه‌ها را فراهم آوردند تشکر می‌نمایند و از زحمات خانم‌ها مونا معتقد، دکتر ژولیت قالدی، سميرامیس طوطیان، فاطمه کامی و آقای ابوالفضل دبیر مقدم قدردانی می‌گردد.

تداخل باندهای غیر اختصاصی در بررسی نتایج قابل اعتماد می‌باشد(۱۱، ۲۱). به دلیل محدودیت زمان در این مطالعه روش فوق انجام نگرفت.

با توجه به تفاوت‌ها در میزان فراوانی HPA-1 و HPA-2 در جامعه ما در مقایسه با جمعیت سفید پوستان اروپایی، به نظر می‌رسد احتمال تحریک تولید آنتی‌بادی ضد پلاکتی توسط این آنتیژن‌ها متفاوت از نتایج سفید پوستان اروپایی در این زمینه باشد و با توجه به مشاهده HPA-1a در همه افراد تحت بررسی، شاید این آنتی‌بادی در ایرانیان موجب بروز عوارض نشود. در عوض آنتی‌بادی HPA-1b/2b/5b/15b ممکن است دارای اهمیت بالینی باشند که اظهار نظر قطعی در این مورد نیاز به بررسی‌های بیشتر و توان برای آنتیژن‌ها و آنتی‌بادی‌های پلاکتی دارد.

در سال ۱۹۹۷ روش الیزا با روش چسبندگی گلبول SPRCA = Solid Phase Red Cell (قرمز به فاز جامد)، Adhesive Assay (بررسی آنتی‌بادی‌ها بر روی ۶۷۵ نمونه سرم قبل از زایمان انجام شد و نمونه‌های منفی با روش PCR-SSP نیز تایید شدند که ۳۶ نمونه با هر دو روش منفی شدند(۷). در مطالعه واتکینز و همکاران در سال ۲۰۰۲، از نمونه‌های به دست آمده از ۶۰۰۰ اهداکننده خون که با دو روش PCR-SSP و الیزا آنتیژن HPA-1a را بررسی نمودند با روش الیزا ۱۰۰ نمونه (۱/۷٪) منفی و ۱ نمونه بینایی‌نی بودند که نمونه اخیر به همراه ۵۴ مورد از نمونه‌های منفی به روش PCR-SSP مورد بررسی قرار گرفتند و مشخص شد هر ۵۴ مورد هموزیگوت-HPA-1b/1b بودند و نمونه بینایی‌نی نیز هتروزیگوت HPA-1a/1b بود(۸). نتایج مطالعاتی که در مقایسه روش الیزا با سایر روش‌های بررسی آنتیژن‌های پلاکتی انجام شده نشان داده‌اند که روش الیزا روشی سریع و قابل اطمینان برای

### References :

- 1- Kickler T. Platelet immunology thrombo kinetiks. In: Anderson KC, Ness PM, editors. Scientific Basic of Transfusion Medicin. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Saunders;2000:227-36.
- 2- Schuh AC, Watkins NA, Nguyen Q, Harmer NJ, Lin M, Prosper JY, *et al.* A tyrosin 703 serin polymorphism of CD109 defines the Gov platelet alloantigens. *Blood* 2002;88(5):1692-8.
- 3- Mohanty D, kulkarni B, Ghosh K, Nair S, Khare A. Human platelet specific antigens and their importance. *Indian Pediatrics* 2004;41:797-805.
- 4- Webert K, Chan H, Smith JW, Heddle N, Kelton J. Red cell platelet and white cell antigens. In: Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, editors. *Wintrob's Clinical Hematology*. 11<sup>th</sup> ed. Philadelphia:Lippincott Williams Wilkins;2004:808-17.
- 5- Kupatawintu P, Nathalang O, Chareon RO, Patmasiriwat P. Gene frequencies of the HPA-1 to 6 and Gov human platelet antigens in Thai blood donors. *Immunohematol* 2005;21(1):5-9.
- 6- Garner SF, Smethurst PA, Merieux Y, Aeby C, Smith G, Armour KL, *et al.* A rapid one-stage whole-blood HPA-1a phenotyping assay using a recombinant monoclonal IgG1 anti-HPA-1a. *Bjh* 2000;108(2):440-7.
- 7- Mohabir LA, Porter L. Semi-automation of platelet HPA-1a phenotyping by SPRCA and ELISA. *Immunohematology* 1997;13:4448 .
- 8- Watkins NA, Schaffner-Reckinger E, Allen DL, Howkins GJ, Nicolaas HC. HPA-1a phenotype-genotype discrepancy reveals a naturally occurring Arg93Gln substitution in the platelet  $\beta 3$  integrin that disrupts the HPA-1a epitope. *Blood* 2002;99(5):1833-9.
- 9- Ficko T, Galvani V, Ruprecht R, Dovc T, Rozman P. Real-Time PCR genotyping of human platelet alloantigens HPA-1, HPA-2, HPA-3 and HPA-5 is superior to the standard PCR-SSP method. *Transfus Med* 2004;14:425-32.
- 10- Koutsogianni P. Nomenclature of human platelet antigens and clinical conditions. *Haema* 2004;7suppl 1:82-8.
- 11- Seo DH, Park SS, Kim DW, Furihata k, Ueno I, Han KS. Gene frequencies of eight human platelet-specific antigens in Korean. *Transfus Med* 1998;8:192-32.
- 12- Metcalfe P. PCR – SSP for HPA - 1 to 5 + 15. <http://www.ebi.ac.uk>
- 13- Metcalfe P, Cavanagh G, Hurd C, Ouwehand WH. HPA genotyping by PCR-SSP: report of 4 exercises. *Vox Sang* 1999;77:40-3.
- 14- Ferrer G, Muniz E, Aluja MP, Arilla M, Martinez C, Servin R. Analysis of human platelet antigen systems in moroccan berber population. *Transfus Med* 2002;12:49-54.
- 15- Sun GD, Duan XM, Zhang YP, Yin ZZ, Niu XL, Li YF, *et al.* Analysis of genetic polymorphism in randomized donor's HPA 1-16 antigens and establishment of typed platelet donor data bank. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2005;13(5):889-95.
- 16- Tomicic M, Bingulac J, Drazic V, Hundric Z. Frequency of HPA-15a and HPA-15b ( Gova/b) human platelet alloantigens in the Croation population. *Arch Med Res* 2006;37(1):172-4.
- 17- Al-Subaie AM , Al-Absi IK, Al-Ola K, Saidi S , Fawaz NA, Almwai WY. Gene frequencies of human platelet alloantigens in Bahraini Arabs. *Am J Hematol* 2007; 82(3):242-4.
- 18- Shih MC, Liu TC, Lin IL, Lin SF, Chen CM, Chang JG. Gene frequencies of the HPA-1 to HPA-13 and Gov platelet antigen allel in Thaiwaese, Indonesian, filipino population. *Int J Mol Med* 2003;12(4):609-14.
- 19- Feng ML, Liu DZ, Shen W, Wang JL, Guo ZH, Zhang X, *et al.* Establishment of an HPA-1- to-16-typed platelet donor registery in China. *Transfus Med* 2006;16:369-74.
- 20- Chiba AK, Bordin JO, Kuwano ST, Figueiredo MS, Carvalho KI, Vieira-Filho JPB, *et al.* Platelet alloantigen frequencies in Amazon, Indians and Brazilian blood donors. *Transfus Med* 2000;10:207-12.
- 21- Simsek S, farber NM, Bleeker PM, Vlekke ABJ, Huiskes E, Goldschmeding R, *et al.* Determination of human platelet antigen frequencies in the Dutch population by immunophenotyping and DNA (allele-specific restriction enzyme) Analysis. *Blood* 1993;81(30):835-40.
- 22- Jones D, Buncet M, Fuggle SV, Young NT, Marshal SE. Human platelet antigens (HPA): PCR-SSP genotyping of a UK population for 15 HPA alleles. *Eur J Immunogenetic* 2003;30(6):415-9.
- 23- Kulkarni B, Mohanty D, Gosh K. Frequency distribution of human platelet antigens in the Indian population. *Transfus Med* 2005;15:119-24.
- 24- Cardone JD, Chiba AK, Boturao E, Vieira-Filho JP, Bordin JO. Gene frequenies of the HPA-15 (Gov) platelet alloantigen system in Brazilians. *Transfus Med* 2004;14:433-7.

## Platelet antigens frequency in blood donors: comparison of molecular detection with ELISA method ( for HPA-1a )

**Madani T.<sup>1</sup>(MS), Samiee Sh.<sup>1</sup>(MS), Attaei Z.<sup>1</sup>(BS), Kavari M.<sup>1</sup>(BS), Babaei Gh.R.<sup>2</sup>(PhD),  
Mostkademian M.<sup>1</sup>(BS), Shaiegan M.<sup>1</sup>(PhD)**

<sup>1</sup>Iranian Blood Transfusion Organization – Research Center

<sup>2</sup>Islamic Azad University- Karaj brand

### Abstract

#### Background and Objectives

Serologic methodes used in HPA-typing are limited due to restricted access to specific anti-sera and decreased platelet count in thrombocytopenic patients. Therefore, several DNA-based HPA-genotyping techniques were used to determine the genotype of HPAs. Since nothing is known about the HPA gene frequency in Iran, this study was performed to determine its frequency in some Iranian blood donors.

#### Materials and Methods

DNA was extracted from a 3-ml whole blood sample prepared from donations of 100 Iranian blood donors collected in EDTA-coated blood tubes. Human platelet (PLT) alloantigens (HPA)-1/2/3/4/5 and HPA-15 typing were performed by the Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Primer technique ( PCR-SSP), and HPA-1a phenotyping was performed by ELISA method for 40 % of samples.

#### Results

The frequencies of HPA genes were: HPA-1a 98% , HPA-1b 2% , HPA-2a 54% , HPA-2b 46% , HPA-3a 48% , HPA-3b 52% , HPA-4a 100% , HPA-5a 99% , HPA-5b 1% , HPA-15a 47% , and HPA-15b 53%. HPA-4b was not found . The frequencies of HPA phenotypes were determined to be: HPA1a/1a 96% , HPA1a/1b 4% , HPA2a/2a 8% , HPA2a/2b 92% , HPA3a/3a 19% , HPA3a/3b 59% , HPA3b/3b 22%, HPA4a/4a 100% , HPA5a/5a 98% , HPA5b/5b 2% , HPA15a/15a 14% , HPA15a/15b 67% , and HPA15b/15b 19%. 40 HPA-1a phenotyping by ELISA showed 26 positive (OD > 0.5 ), 4 negative (OD < 0.3 ), and 10 indeterminate samples (0.3 < OD < 0.5 ) .

#### Conclusions

No HPA-1b/b homozygous genotype similar to other Asian studies was found. Since HPA-1,-2,-5 frequencies in the population under study differ from the European Caucasian race, it seems that antibody production in our population might be different from other Caucasians. According to HPA frequencies, it seems that HPA-2b, HPA-5b and HPA-15b may induce posttransfusion purpura and platelet refractoriness which need further investigation.

**Key words:** Platelet antigens, Gene frequency, PCR, Iran

*SJIBTO 2007; 4(3): 165-174*

Received: 8 Aug 2007

Accepted: 15 Oct 2007

*Correspondence:* Shaiegan M., PhD of Immunology. IBTO – Research Center.  
P.O.Box:14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821)88601599; Fax : (+9821)88601599  
E-mail: shaiegan@ibto.ir