خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۵ شماره ۲ تابستان ۸۷ (۱۰۸-۹۹)

بررسی غربالگری آنتی‌بادی‌های نامنظم و تعیین نوع آنتی‌بادی‌ها به روش ژل در بیماران تالاسمی

دکتر آزیتا آذرکیوان[۱]، محمدحسین احمدی[۲]، دکتر احمد قره‌باغیان[۳]، دکتر سیما ذوالفقاری انارکی[۴]، دکتر سهیلا ناسی‌زاده[۵]، دکتر مهتاب مقصودلو[۶]، دکتر عبدالمجید طولابی[۷]، پروین لطفی[۸]

چکیده

سابقه و هدف

بیماران تالاسمی به علت ماهیت مزمن بیماری به تزریق خون مداوم نیاز دارند. چون در تزریق خون فقط گروه‌های خونی اصلی کنترل می‌شوند، ایجاد آنتی‌بادی علیه سایر گروه‌های خونی(آنتی‌بادی‌های نامنظم یا آلوآنتی‌بادی) در این بیماران می‌تواند باعث بروز واکنش‌های خونی(واکنش همولیتیک تاخیری) گردیده و عوارضی را به وجود آورد. در این مطالعه، غربالگری و تایپینگ آنتی‌بادی‌های نامنظم با روش ژل بررسی شده است.

مواد وروش‌ها

در یک مطالعه توصیفی، ۴۴۱ بیمار تالاسمی مراجعه کننده به درمانگاه بیماران تالاسمی بزرگسال تهران(ظفر) و مرکز تالاسمی قزوین مورد بررسی قرار گرفتند. فرم‌های اطلاعاتی در مورد وضعیت تزریق خون برای کلیه بیماران تکمیل گردیده و از کلیه بیماران، نمونه خون گرفته شد. قبل از انجام آزمایش‌های غربالگری به روش ژل، برای کلیه بیماران تست کومبس غیر مستقیم به روش لوله‌ای انجام شد و سپس همین تست به روش ژل بر اساس دستورالعمل استاندارد آن صورت گرفته و نتایج حاصله بر اساس فرم‌های تکمیل شده توسط بیماران با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۱۱/۵ و آزمون آماری کای‌دو(Chi-square)، با اطمینان ۹۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

بیماران مورد بررسی شامل ۲۳۴ مرد(۵۳/۱٪) و ۲۰۷ زن(۴۶/۹٪) با میانگین سنی ۲۲/۶ (SD ± ۹/۲۷) سال و از این تعداد، ۳۶۲ بیمار تالاسمی ماژور(۸۲/۱٪) و ۷۹ بیمار، تالاسمی اینترمدیا(۱۷/۹٪) بودند. از مجموع ۴۴۱ نمونه بررسی شده در غربالگری بیماران، ۳۹۱ بیمار(۸۸/۷٪) فاقد آلوآنتی‌بادی و ۵۰ بیمار(۱۱/۳٪) دارای آلوآنتی‌بادی بودند که در بین آنتی‌بادی‌های شناسایی شده، Anti-Kell در ۲۸ درصد و Anti-D در ۱۶ درصد و آنتی‌بادی بر علیه زیر گروه‌های دیگر Rh شامل E، e ، C، c و Cw در ۲۶ درصد بیشترین مقدار را تشکیل می‌دادند. در مقایسه نتایج روش ژل میکروتیوب با روش لوله‌ای، ۲۶ بیمار که با روش ژل به عنوان مورد مثبت شناسایی شده بودند، با روش لوله‌ای که در حال حاضر در ایران انجام می‌شود، نتایج منفی داشتند.

نتیجه گیری

با توجه به شیوع آلوایمیونیزاسیون در بیماران تالاسمی که بیشتر از دو سوم آن‌ها مربوط به زیر گروه‌های Rh ، به خصوص c ، C ، E و گروه Kell می‌باشد، امروزه توصیه می‌شود در بیماری که به تازگی تشخیص تالاسمی داده شده، قبل از آغاز تزریق خون، علاوه بر ABO ، گروه‌های Rh ، Kell ، Kidd ، Duffy برای او نیز تعیین شود تا فنوتیپ گروه‌های خونی مهم بیمار را داشته باشیم. در ضمن ثابت شده، اگر در هر بار تزریق خون و آزمون‌های سازگاری(کراس‌مچ)، انتخاب کیسه خون بر اساس گروه‌های Rh و Kell و مطابق با فنوتیپ بیمار صورت پذیرد، می‌توان تا ۹۰٪ از بروز آلوایمیونیزاسیون کاست.

کلمات کلیدی: غربالگری، تالاسمی، انتقال خون، ایمیونیزاسیون

تاریخ دریافت : ۸۶/ ۸/ ۵
تاریخ پذیرش : ۸۷/ ۶/ ۱۲

۱ـ مؤلف مسؤول: فوق تخصص هماتولوژی کودکان ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و درمانگاه تالاسمی
۲ـ کارشناس ارشد هماتولوژی ـ مربی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
۳ـ PhD ایمونوهماتولوژی بالینی ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون
۴ـ متخصص آسیب‌شناسی ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۵ـ متخصص آسیب‌شناسی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۶ـ متخصص پزشکی اجتماعی ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۷ـ پزشک عمومی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۸ـ کاردان علوم آزمایشگاهی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

مقدمه

تالاسمی شایع‌ترین کم خونی ارثی در جهان است که بیماران مبتلا به علت ماهیت بیماری نیاز به تزریق خون مداوم دارند(۱). اما از آن جایی که در انتخاب خون تزریقی، فقط گروه‌های اصلی ABO و Rh (D) کنترل شده و سایر گروه‌های خونی در نظر گرفته نمی‌شوند، بنابراین بیمارانی که به طور مکرر خون دریافت می‌دارند می‌توانند به مرور زمان آنتی‌بادی علیه زیر گروه‌های فرعی به وجود آورند(آنتی‌بادی‌های نامنظم) و همین امر باعث بروز واکنش‌های خونی(واکنش همولیتیک تاخیری) می‌گردد(۲). در اثر برخورد مکرر با آنتی‌ژن مربوطه مقدار این آنتی‌بادی‌ها ممکن است بالا رفته و در تزریق خون این بیماران مشکلاتی را به وجود آورد(۳). مطالعات نشان می‌دهد که بیشتر از دو سوم میزان این واکنش‌ها مربوط به واکنش به سایر زیر گروه‌های Rhو به خصوص c ، C ، E ، گروه‌های Kell ، Kidd و Duffy (Fy^b, Fy^a) می‌باشد(۶-۴). بیشتر این واکنش‌ها از نوع همولیتیک تاخیری بوده که علاوه بر کم خونی و عدم افزایش هموگلوبین پس از تزریق خون، باعث ایجاد زردی و احساس خستگی مداوم در بیماران می‌شود(۷).

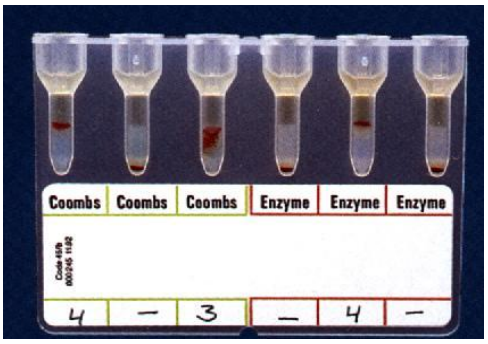
البته اگر بدن بیماری آنتی‌بادی تولید کرده باشد این آنتی‌بادی‌ها را در هنگام تزریق خون و در آزمایش سازگاری(کراس‌مچ) می‌توان به دقت تشخیص داد، لذا در این بیماران غربالگری نوع آنتی‌بادی می‌تواند به تشخیص آنتی‌ژنی کمک کند(۸). از طرفی با یافتن نوع آنتی‌بادی(از طریق آزمایش‌های تخصصی، پانل سل) می‌توان اقدامات درمانی انجام داد، یعنی نوع آنتی‌ژنی که بیمار فاقد آن است را تعیین می‌کنیم و هر بار که بیمار خون فاقد آن آنتی‌ژن را دریافت می‌نماید، میزان تیتر آنتی‌بادی به مرور کاهش یافته و از عوارض فوق کاسته می‌شود. اما مساله اصلی، پیشگیری از بروز این آلوآنتی‌بادی‌ها است(۹). ثابت شده است که اگر در هر بار کراس‌مچ یا آزمایش سازگاری، علاوه بر گروه‌های ABO و Rh (D) آزمایش برای زیر گروه‌های Rh و Kell نیز انجام شود، تا حد زیادی از تشکیل این آلوآنتی‌بادی‌ها کاسته می‌شود(۱۱، ۱۰).

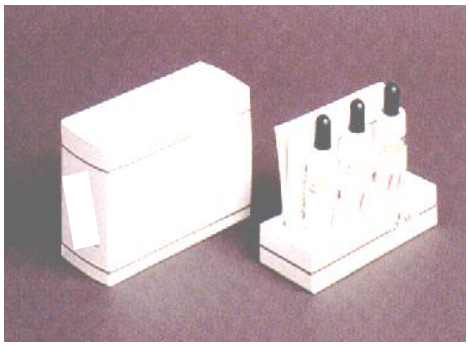
روش جدیدی که اکنون برای غربالگری و تعیین هویت آنتی‌بادی ها وجود دارد، روش میکروتیوب یا ژل است که در محیط جامد و در لوله‌های کوچک انجام می‌شود(۱۳، ۱۲). این روش بیش از ۱۰ سال است که در دنیا به کار می‌رود ولی در ایران هنوز رایج نشده است. در این مطالعه بر آن شدیم که غربالگری و تعیین نوع آنتی‌بادی‌های نامنظم را به این روش انجام دهیم تا در صورت دست‌یابی به جواب مناسب، بتوان از این روش برای تشخیص قطعی بیماران پرخطر (High Risk) استفاده کرد.

مواد و روش ها

این تحقیق به روش توصیفی انجام شد. بیماران تالاسمی مراجعه کننده به درمانگاه تالاسمی ظفر تهران و درمانگاه تالاسمی کودکان قدس قزوین مورد بررسی قرار گرفتند. برای کلیه بیماران فرم‌های اطلاعاتی شامل نوع تالاسمی، سن شروع تزریق، استمرار دفعات تزریق، وجود واکنش تزریق خون، تعداد دفعات واکنش، نوع خون مصرفی، گروه‌های خونی اصلی و فرعی، وضعیت مصرف دارو، سابقه طحال‌برداری و سن طحال‌برداری تکمیل گردیده و از کلیه بیماران، نمونه خون گرفته شد.

ابتدا با استفاده از سرم جدا شده، برای کلیه بیماران آزمایش غربالگری آنتی‌بادی به روش لوله‌ای انجام شد. در روش لوله‌ای(روش معمول در ایران که انجام این روش در مطالعه طبق دستورالعمل وقت انجام شد)، سرم بیمار با گلبول‌های گروه خونی O مجاور شد و جهت غربالگری اولیه عمدتاً از سلول‌های مخلوط شده O استفاده گردید. لوله Ocell (یا سلول‌های غربالگر) با مخلوط کردن دو تا سه گروه خونی O مثبت در یک لوله به دست می‌آید. لازم به ذکر است که در ضمن تهیه این سوسپانسیون سلولی، هیچ گونه شناسایی آنتی‌ژنی روی سلول‌های مخلوط شده انجام نشده و سلول‌ها به صورت اتفاقی انتخاب می‌گردند. در این تحقیق روش لوله‌ای در سه فاز درجه حرارت اتاق (RT)، آلبومین و فاز آنتی هیومن گلوبولین(مطابق با دستوالعمل استاندارد این روش) کنترل شد. سپس غربالگری آنتی‌بادی یا همان آزمایش کومبس غیر مستقیم به روش ژل بر اساس روش استاندارد طبق دستورالعمل مربوطه (مطابق بروشور) از لحاظ وجود و یا عدم وجود





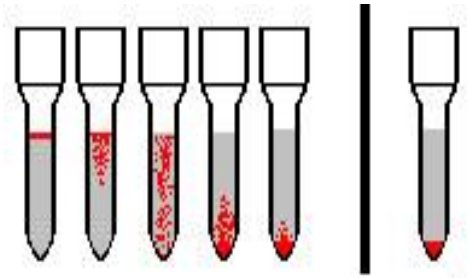
شکل ۱: نمونه لوله‌های سلول‌های غربالگر(۳، ۲، ۱ ؛ Dia cell) ومحیط ژل که در دو سیستم Liss coombs و آنزیم انجام می‌شود

آگلوتیناسیون و نیز الگوی واکنش انجام شد. در این روش سرم بیمار در سه چاهک جداگانه ریخته شده و با سه سری سلول با آنتی‌ژن‌های شناخته شده مجاور می‌شود(۳، ۲، ۱ ؛ Dia cell) و آزمایش در محیط جامد(ژل) صورت می‌گیرد. این غربالگری در دو سیستم لیس‌کومبس و آنزیم انجام می‌شود که در روی کارت‌های آزمایش مشخص است(شکل ۱).

روش آنزیم برای شکستن آنتی‌ژن‌های بزرگ سطح گلبول قرمز است که بعد از آنتی‌ژن‌های کوچک‌تر در معرض آنتی‌بادی بیمار قرار می‌گیرد و اگر بیمار علیه این آنتی‌ژن‌ها حساس شده باشد در جواب آزمایش مشخص می‌شود.

در صورت وجود آلوآنتی‌بادی، بر اساس شدت واکنش صورت گرفته این آنتی‌بادی در سطح ژل و یا در طول مسیر رسوب می‌کند که شدت واکنش به صورت ۱+ تا ۴+ درجه‌بندی شده و مطابق چارت مخصوص خوانده می‌شود. در صورتی که بیمار آنتی‌بادی نداشته باشد، هیچ کمپلکسی تشکیل نشده و گلبول‌ها به صورت آزاد در حین سانتریفوژ از بین ذرات عبور کرده و در ته ویال به صورت توده‌های کوچکی ته‌نشین می‌شوند(شکل ۲).

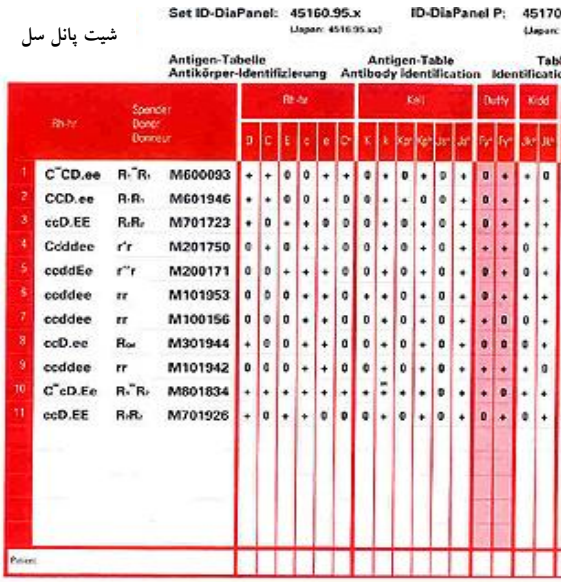
برای بیمارانی که در غربالگری اولیه نتایج مثبت نشان دادند آزمایش تعیین هویت آنتی‌بادی با روش ژل انجام شد. به این ترتیب که نمونه‌گیری مجدد از بیمار به عمل آمد و در این مرحله از سلول‌های پانل که در دو ست آنزیمی و معمولی و شامل یازده نوع سلول با آنتی‌ژن‌های مشخص (cell 1P & 2P & 3P) بودند، استفاده شد. مراحل انجام آزمایش و نحوه انکوباسیون و سانتریفوژ همانند آزمایش غربالگری انجام شد و پس از پایان مراحل ذکر شده، الگوی واکنش با استفاده از جدول همراه پانل‌ها خوانده و نوع آنتی‌بادی مشخص شد(شکل ۳).



شکل ۲: درجه‌بندی مثبت و یا منفی در سیستم ژل

لازم به ذکر است که هدف از این مطالعه، غربالگری و تعیین نوع آنتی‌بادی‌های نامنظم به روش ژل به عنوان یک روش جدید است و هدف مقایسه روش ژل و لوله‌ای نیست چون هم محیط و هم سلول‌های این دو روش متفاوت است.

اما چون به طور معمول روش لوله‌ای انجام می‌شود، این دو آزمایش برای بیماران انجام شد، تا تخمینی از دقت نتایج آزمایش به دست آید. نتایج اطلاعات حاصله با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۱۱/۵ و با استفاده از آزمون کای‌دو و با اطمینان ۹۵ درصد مورد بررسی قرار گرفتند. p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.


شیت پانل سل

Set ID-DiaPanel: 45160.95.x
ID-DiaPanel P: 45170

	Rh-hr	Spender Donor Donneur		D	C	E	c	e	Cw	K	k	Kpa	Kpb	Jsa	Jsb	Fya	Fyb	Jka	Jkb
1	C͞CD.ee	R₁͞R₁	M600093	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0
2	CCD.ee	R₁R₁	M601946	+	+	0	0	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+
3	ccD.EE	R₂R₂	M701723	+	0	+	+	0	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+
4	Cᵈdee	r'r	M201750	0	+	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+
5	ccddEe	r''r	M200171	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+
6	ccddee	rr	M101953	0	0	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+
7	ccddee	rr	M100156	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+
8	ccD.ee	R₀r	M301944	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	0	0	+
9	ccddee	rr	M101942	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0
10	C͞cD.Ee	R₁͞R₂	M801834	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	0	+	+	0	+	+
11	ccD.EE	R₂R₂	M701926	+	0	+	+	0	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+

شکل ۳: نمونه صفحه آزمایش با سلول‌های پانل cell1P&2P&3P برای تعیین نوع آنتی‌بادی

یافته ها

تحقیق بر روی ۴۴۱ بیمار شامل ۲۳۴ مرد(۵۳/۱٪) و ۲۰۷ زن(۴۶/۹٪) در محدوده سنی ۱ تا ۶۱ سال با میانگین سنی ۲۲/۶(SD ± ۹/۲۷) انجام شد(به علت این که مرکز تالاسمی قزوین مرکز درمانی کودکان است، لذا طیف سنی در این محدوده وسیع قرار گرفت). از این تعداد ۳۶۲ بیمار(۸۲/۱٪) تالاسمی ماژور و ۷۹ بیمار(۱۷/۹٪)، تالاسمی اینترمدیا بودند(جدول ۱).

جدول ۱: توزیع بیماران بر حسب جنس و نوع تالاسمی

جنس / نوع تالاسمی	مرد		زن		جمع
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	(درصد)
تالاسمی ماژور	۱۸۸	۴۲/۶	۱۷۴	۳۹/۵	۳۶۲(۸۲/۱)
تالاسمی اینترمدیا	۴۶	۱۰/۴	۳۳	۷/۵	۷۹(۱۷/۹)
جمع	۲۳۴	۵۳/۱	۲۰۷	۴۶/۹	۴۴۱(۱۰۰)

سن شروع تزریق خون از، ابتدای تولد تا ۵۱ سالگی با میانگین ۳/۵ سال(SD ± ۶) بود. در بین بیماران ۳۵۶ نفر(۸۰/۷٪) تحت تزریق خون منظم بودند و ۸۵ نفر(۱۹/۳٪) تحت درمان‌های جایگزین مثل کپسول هیدروکسی اوره بوده و فقط در مواقع کم خونی شدید به طور نامرتب تزریق خون انجام می‌دادند. ۲۸۸ بیمار(۶۵/۳٪) از خون یک بار شسته شده و فیلتر شده، ۱۵۰ بیمار(۳۴٪) فقط از خون فیلتر شده و ۳ بیمار(۰/۷٪) از خون ۳ بار شسته شده به همراه فیلتر استفاده می‌کردند. از بین بیماران، ۳۶۸ نفر(۸۳/۴٪) هیچ سابقه قبلی از واکنش به تزریق خون نداشتند در حالی که ۷ نفر(۱/۶٪) عوارض همولیتیک، ۲۵ نفر(۵/۷٪) علایم آلرژیک و ۴۱ نفر(۹/۳٪) واکنش‌های تب‌زا را در حین تزریق خون بروز داده بودند. ۲۲۲ نفر(۵۰/۳٪) از افراد مورد مطالعه طحال‌برداری شده و ۲۱۹ نفر(۴۹/۷٪) طحال‌برداری نشده بودند که این افراد در محدوده سنی ۲ تا ۴۵ سال با میانگین ۱۲/۰۲ سال(SD ± ۷/۷۲) قرار داشتند.

در غربالگری آنتی‌بادی به روش ژل، ۳۹۱ بیمار (۸۸/۷٪) فاقد آلوآنتی‌بادی و ۵۰ بیمار(۱۱/۳٪) دارای

آلوآنتی‌بادی‌های مهم بالینی بودند(جدول ۲). هم چنـین از بین بیماران دارای آلوآنتی‌بادی، ۳۷ نفـر(۷۴٪) دارای یـک آنتی‌بادی، ۸ نفر(۱۶٪) دارای دو آنتی‌بـادی و ۵ نفـر دارای

آنتی‌بادی‌هایی بودند که شناسایی آن‌ها با پانل‌های موجود ممکن نشد. از نظر تعیین نوع آنتی‌بادی بر طبق دستورالعمل انجام شده، در بین آنتی‌بادی‌های شناسایی شده Anti-Kell در ۲۸ درصد، Anti-D در ۱۶ درصد و آنتی‌بادی بر علیه زیر گروه‌های دیگر Rh شامل E ، e ، C ، c و Cw در ۲۶ درصد بیشترین مقدار را تشکیل می‌دادند.

۸ بیمار دارای دو نوع آنتی‌بادی بودند که این آنتی‌بادی‌ها شامل Anti-D & C (۸ درصد)، Anti-D & E (۲ درصد)، Anti-Kell & E(۲ درصد)، Anti- Kell & D (۲ درصد)، Anti- Kell & Kpa (۲ درصد) بودند. این آنتی‌بادی‌ها نیز ترکیبی از زیر گروه‌های Rh و یا زیر گروه‌های Rh و Kell بودند. ۲ بیمار(۴ درصد) نیز آنتی‌کولتون داشتند(جدول ۳). در مقایسه نتایج روش ژل با غربالگری آنتی‌بادی به روش لوله‌ای تنها در ۲۵ بیمار نتیجه مثبت به دست آمد. در واقع ۲۶ بیمار از ۵۱ بیمار(۵۲٪) که با روش ژل در غربالگری به عنوان مورد مثبت شناسایی شده بودند، در غربالگری با روش لوله‌ای منفی بودند، ۴ بیمار(۸٪) هم در روش لوله‌ای و هم در روش ژل میکروتیوب غربالگری و تعیین هویت مشابهی داشتند.

جدول ۲: نتایج غربالگری آنتی‌بادی به روش ژل بر حسب نوع تالاسمی

نوع تالاسمی / روش ژل	ماژور		اینتر مدیا		جمع (٪)
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
مثبت	۳۲۵	۷۳/۷	۶۶	۱۵	۳۹۱ (۸۸/۷)
منفی	۳۷	۸/۴	۱۳	۲/۹	۵۰ (۱۱/۳)
جمع	۳۶۲	۸۲/۱	۷۹	۱۷/۹	۴۴۱ (۱۰۰)

اگر چه بین سن بیمار و نوع تالاسمی با تعداد واحدهای خون دریافتی ارتباط مستقیمی وجود دارد، یعنی هر چه سن بالاتر و نوع تالاسمی ماژور باشد، میزان واحدهای دریافتی بیشتر است ولی در این مطالعه هیچ ارتباطی بین این دو پارامتر و تشکیل آلوآنتی‌بادی‌ها وجود نداشت. هم چنین بین مرتب بودن فواصل خونگیری، نوع خون مصرفی و تشکیل آلوآنتی‌بادی‌ها هیچ ارتباط معنی‌داری وجود نداشت.

در این تحقیق وجود و یا فقدان طحال و سن طحال‌برداری مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که هیچ کدام رابطه معنی‌داری با بروز آلوآنتی‌بادی‌ها نداشتند(جدول ۴).

در این تحقیق ۷ بیمار که در غربالگری مثبت بودند سابقه واکنش‌های همولیتیک در حین تزریق خون داشتند که این حالت به طور معنی‌داری با تشکیل آلوآنتی‌بادی‌ها در ارتباط بود($p< ۰/۰۵$).

جدول ۳: توزیع آلوآنتی‌بادی‌های به دست آمده و محاسبه درصد در کل بیماران و در بین بیماران مثبت با روش ژل

نتایج		فراوانی	درصد در کل	درصد واقعی
مثبت	Anti Kell	۱۴	۳/۲	۲۸/۰
	Anti D	۸	۱/۸	۱۶/۰
	Anti E	۴	۰/۹	۸/۰
	Anti c	۴	۰/۹	۸/۰
	Anti cw	۳	۰/۷	۶/۰
	Anti e	۱	۰/۲	۲/۰
	Anti D & C	۴	۰/۹	۸/۰
	Anti D & E	۱	۰/۲	۲/۰
	Anti colb	۲	۰/۵	۴/۰
	Anti C	۱	۰/۲	۲/۰
	Anti Kell & E	۱	۰/۲	۲/۰
	Anti Kell & KPa	۱	۰/۲	۲/۰
	Anti Kell & D	۱	۰/۲	۲/۰
	Unknown	۴	۰/۹	۸/۰
	Auto antibody	۱	۰/۲	۲/۰
	Total	۵۰	۱۱/۳	۱۰۰/۰
منفی		۳۹۱	۸۸/۷	
جمع کل		۴۴۱	۱۰۰/۰	

جدول ۴: رابطه بین متغیرهای گوناگون و تعیین ارتباط با تشکیل آلوآنتی‌بادی‌ها

عوامل مرتبط / آلوآنتی‌بادی		نداشته (درصد) N = ۳۹۱	داشته (درصد) N = ۵۰	نتیجه آزمون
جنس	مرد	(۸۹/۷)۲۱۰	(۱۰/۳)۲۴	NS P = ۰/۴۴۶
	زن	(۸۷/۴)۱۸۱	(۱۲/۶)۲۶	
نوع تالاسمی	ماژور	(۸۹/۸)۳۲۵	(۱۰/۲)۳۷	NS P = ۰/۱۱۳
	اینتر مدیا	(۸۳/۵)۶۶	(۱۶/۵)۱۳	
مرتب بودن تزریق	بله	(۸۹/۵)۳۲۰	(۱۰/۱)۳۶	NS P = ۰/۰۹۷
	خیر	(۸۳/۵)۷۱	(۱۶/۵)۱۴	
سابقه واکنش	همولیتیک	(۰)۰	(۱۰۰)۷	P = ۰/۰۰۳ R= ۰/۹۵
	آلرژیک	(۱۰۰)۲۵	(۰)۰	
	تب‌زا	(۸۲/۹)۳۴	(۱۷/۱)۷	
	بدون واکنش	(۹۰/۲)۳۳۲	(۹/۸)۳۶	
خون مصرفی	فیلتر شده یک‌بار شستشو با فیلتر	(۸۹/۳)۱۳۴	(۱۰/۷)۱۶	NS P = ۰/۴۶۹
	سه بار شستشو با فیلتر	(۸۸/۵)۲۵۵	(۱۱/۵)۳۳	
		(۶۶/۷)۲	(۳۳/۳)۱	
طحال‌برداری	بله	(۸۶)۱۹۱	(۱۴)۳۱	NS P = ۰/۰۸۰
	خیر	(۹۱/۳)۲۰۰	(۸/۷)۱۹	

بحث

آلوایمونیزاسیون یعنی تولید آنتی‌بادی بر علیه آنتی‌ژن‌هایی که فرد ندارد(آلوآنتی‌بادی). این آنتی‌بادی‌ها بیشتر مربوط به آنتی‌ژن‌های گلبول قرمز است. وقوع آلوآنتی‌بادی در ۰/۲ تا ۳۸ درصد افراد جامعه وجود دارد. عمدتاً آلوآنتی‌بادی‌ها در پاسخ به تزریق خون ناسازگار، مخلوط شدن خون جنین با خون مادر و به ندرت در اثر پیوند و یا تزریق مواد آلوژنیک به وجود می‌آید.

یکی از گروه‌های پرخطر جامعه به لحاظ تشکیل آلوآنتی‌بادی، بیماران تالاسمی هستند. آنتی‌ژن‌های سطح گلبول قرمز، متعدد هستند اما برای تزریق خون، گروه‌های ABO و Rh(D) کنترل می‌شوند و از آن جایی که بیماران تالاسمی به طور مداوم تزریق خون دارند، ممکن است بر علیه سایر آنتی‌ژن‌های گلبول قرمز نیز آنتی‌بادی بسازند که این امر می‌تواند در تزریق خون‌های بعدی موجب بروز واکنش‌های خونی گردد. همان طور که اشاره شد میان آنتی‌ژن‌های گروه خونی، زیر گروه‌های(C ، c ، E ، e ، D) Rh و گروه Kell خاصیت آنتی‌ژنسیتی بیشتری دارند و لذا قابلیت تحریک سیستم ایمنی را دارا می‌باشند.

در مطالعه‌ای که توسط بهاتی و همکارانش در سال ۲۰۰۴ انجام گرفت، ۱۶۱ بیمار تالاسمی انتخاب شده و این بیماران از لحاظ وجود آلوآنتی‌بادی با روش ژل میکروتیوب، مورد غربالگری و تعیین هویت آنتی‌بادی قرار گرفتند(۱۴).

در این تحقیق آلوآنتی‌بادی بر علیه گلبول‌های قرمز در ۴/۹۷ درصد بیماران مشاهده شد که قسمت عمده این

آنتی‌بادی‌ها مربوط به آنتی‌ژن‌های سیستم Rh و ۳ بیمار به ترتیب دارای آنتی Kell ، آنتی Jsb و آنتی Jka بودند.

در این تحقیق مشخص شد بین تشکیل آلوآنتی‌بادی‌ها و سن شروع تزریق، تعداد دفعات تزریق خون و قومیت بیماران هیچ ارتباط معنی‌داری وجود ندارد.

آمین و همکارانش در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۳ در کشور کویت، ۱۹۰ بیمار مبتلا به تالاسمی را از لحاظ وجود آلوآنتی‌بادی و اتوآنتی‌بادی و سن تشکیل آلوآنتی‌بادی مورد بررسی قرار دادند(۱۵). در این تحقیق آن‌ها بیماران را به دو گروه عرب کویتی و عرب غیر کویتی تقسیم کرده و مورد ارزیابی قرار دادند. با این پژوهش مشخص شد که ۵۷ بیمار(۳۰٪) آلوآنتی‌بادی داشتند که از این میان، آنتی‌بادی‌ها بر علیه گروه‌های Rh و Kell بخش عمده آنتی‌بادی‌های مهم بالینی را تشکیل می‌دادند. آنتی Kell در ۴۱ بیمار(۷۲٪) و به دنبال آن آنتی E در ۲۶ بیمار(۴۵/۶٪) مشاهده شد. ۲۱ بیمار(۱۱٪) دارای اتوآنتی‌بادی بودند. در این مطالعه هم چنین مشخص شد ۶۶ مورد از آنتی‌بادی‌ها(۴۹/۶٪) در سنین ۲ تا ۱۰ سال تشکیل شده‌اند. این محققان معتقدند که فاکتورهای مختلفی نظیر ناهمگونی جمعیت ساکن در کویت، ضعف در سازگار کردن صحیح خون‌های اهدایی و دریافت‌کنندگان خون و استفاده از خون‌های Post- Storage Leukodepleted از عوامل موثر در شیوع بالای آلوآنتی‌بادی‌ها در بیماران تالاسمی کویتی هستند.

نورول و همکارانش در یک تحقیق جالب در سال ۱۹۹۴ به بررسی اثر تزریق خون ناهمگون از لحاظ زیر گروه‌های سیستم Rh و Kell در کاهش آلوایمونیزاسیون بر علیه گلبول‌های قرمز پرداختند(۱۶). در این تحقیق ۱۷۳ بیمار مبتلا به کم خونی داسی شکل مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه ۴۹ بیمار از خون منجمد استفاده می‌کردند که از لحاظ سیستم Rh و Kell کاملاً شناخته شده بودند. شیوع آلوآنتی‌بادی‌ها در این بیماران ۸/۲ درصد بود و آنتی‌بادی‌ها عموماً بر علیه گروه‌های Jka ، Jkb ، Fya و S بودند و در یک بیمار دو نوع آنتی‌بادی مشاهده شد. در گروه کنترل که ۱۲۴ بیمار باقیمانده بودند و هیچ کنترلی بر روی خون‌های تزریقی آن‌ها به لحاظ زیر گروه‌های Rh و Kell انجام نشده بود، شیوع آلوآنتی‌بادی‌ها به طور قابل ملاحظه‌ای تا ۳۰/۶ درصد افزایش پیدا کرد و این آنتی‌بادی‌ها عمدتاً بر علیه گروه‌های C ، E ، Kell و Fya بودند($p< ۰/۰۵$). در گروه اول، تشکیل آنتی‌بادی‌ها به طور متوسط بعد از ۹ بار تزریق و در گروه کنترل به طور متوسط بعد از ۳۲ بار تزریق رخ داده بود. به منظور بررسی اثر نژادی در تشکیل آلوآنتی‌بادی، برای بیمارانی که آلوآنتی‌بادی داشتند پانل تشخیص آنتی‌ژن انجام شد. با این عمل مشخص شد در بیمارانی که آنتی‌ژن‌های Jkb ، C ، S ، Fyb Fya ، Kell را نداشتند به طور قابل ملاحظه‌ای آلوآنتی‌بادی تشکیل شده بود.

در مطالعه مشابه دیگری که توسط اسپانوس و همکارانش در یونان انجام شد، ۲۴۵ بیمار مبتلا به تالاسمی مورد بررسی قرار گرفتند(۱۷). در این تحقیق یک گروه از بیماران در تزریق خون، خون‌های سازگار از نظر آنتی‌ژن‌های زیر گروه‌های سیستم Rh و Kell دریافت کردند و در گروه دیگر، زیر گروه‌های سیستم‌های مذکور کنترل نشده بود. در این پژوهش مشخص شد که از ۱۶۲ بیمار که خون سازگار با سیستم Rh و Kell دریافت می‌کردند، تنها ۳/۷ درصد آلوآنتی‌بادی ساخته بودند در حالی که در ۸۳ بیمار که فقط از نظر ABO و Rh(D) خون سازگار گرفته بودند، ۱۵/۷ درصد آلوآنتی‌بادی تشکیل شده بود که از این تعداد ۳۴ درصد مربوط به زیر گروه‌های Rh و ۳۰ درصد مربوط به گروه Kell بود. این محققین به این نتیجه رسیدند که برای پیشگیری از تشکیل بخش عمده آلوآنتی‌بادی‌ها در بیماران تالاسمی، این بیماران باید خون سازگار از نظر زیر گروه‌های Rh و Kell دریافت کنند.

در تحقیق ما که روی ۴۴۱ بیمار انجام شد، شیوع آلوآنتی‌بادی‌ها ۱۱/۳ درصد بود که Anti – Kell در ۲۸ درصد و Anti-D در ۱۶ درصد و آنتی‌بادی بر علیه زیر گروه‌های دیگر Rh شامل E ، e ، C ، c و Cw در ۲۶ درصد بیشترین مقدار را تشکیل می‌دادند که نتایج فوق با سایر مطالعات در این زمینه مطابقت دارد.

در نتایج به دست آمده از روش ژل میکروتیوب و روش لوله‌ای مشخص شد که ۲۶ مورد(۵۲ درصد) از مواردی که با روش ژل مثبت شده بودند با روش لوله‌ای

معمولی منفی بودند. در مطالعه‌ای در زاهدان روی ۱۶۳ بیمار تالاسمی با وجودی که غربالگری با تست کومبس غیر مستقیم به روش لوله‌ای در دو مرکز(تهران و زاهدان) انجام شده بود و بیماران علامت‌دار بودند اما هیچ مورد مثبتی یافت نشد(۱۸).

به نظر می‌رسد این اختلاف به علت عدم انجام آزمایش لوله‌ای به شکل استاندارد در ایران و عدم استفاده از پانل سل مطمئن و استاندارد می‌باشد. چون اصولاً در کشور ما گلبول‌های مورد استفاده در غربالگری از مخلوط کردن دو یا سه سلول O^+ به دست می‌آیند که هیچ شناسایی آنتی‌ژنی بر روی آن‌ها صورت نگرفته است. در نتیجه اولاً ممکن است آنتی‌ژنی که بیمار بر علیه آن آنتی‌بادی ساخته در سلول‌های مورد نظر وجود نداشته باشد، ثانیاً در اثر مخلوط کردن دو یا چند سلول، آنتی‌ژن‌های موجود روی هر سلول رقیق شده و از مقدار تراکم آنتی‌ژنی در سوسپانسیون سلولی کاسته شود، ثالثا نظر به این که برخی از آنتی‌بادی‌ها خاصیت دوزاژ دارند و با سلول‌های هموزیگوت برای آنتی‌ژن واکنش می‌دهند، مخلوط کردن آنتی‌ژنی می‌تواند باعث تجمع آنتی‌ژن‌ها به صورت هتروزیگوت شود. در نتیجه آنتی‌بادی‌هایی که دارای خاصیت دوزاژ هستند مخصوصاً در مواقعی که تیتر پایینی داشته باشند، قابل شناسایی نخواهند بود.

گر چه همان طور که در ابتدا ذکر شد هدف، مقایسه این دو روش نبود اما چون به طور معمول روش در آزمایشگاه‌ها انجام می‌شود لذا این کار برای انجام مقایسه از نظر پاسخ صورت پذیرفت.

نتیجه‌گیری

با توجه به شیوع آلوایمیونیزاسیون در بیماران تالاسمی که بیشتر از دو سوم آن‌ها مربوط به زیر گروه‌های Rh و به خصوص c ، C ، E و گروه Kell می‌باشد، امروزه توصیه می‌شود در یک بیمار تالاسمی که بیماری وی تازه تشخیص داده شده است علاوه بر تعیین گروه‌هایABO ، گروه‌های Rh ، Kell ، Kidd ، Duffy هم تعیین شود و ترجیحاً در هر بار کراس‌مچ، گروه کیسه بر اساس زیر گروه‌های Rh و گروه Kell نیز کنترل شده و سپس تزریق انجام شود. با این کار می‌توان تا ۹۰٪ از بروز آلوآنتی‌بادی‌ها کاست. حتی پیشنهاد می‌شود که برای بیماران تالاسمی از خون اهداکنندگان مستمر استفاده شود چون علاوه بر این که این گروه از نظر عفونت‌های منتقله از راه خون، جزو مطمئن‌ترین گروه برای اهدای خون هستند، بیماران تالاسمی از طریق دریافت خون(این اهداکنندگان) با آنتی‌ژن‌های محدودتری برخورد پیدا کرده و خطر آلوایمیونیزاسیون کاهش می‌یابد.

تشکر و قدردانی

در این جا لازم است از مسؤولین شرکت رونتگن، آقای دکتر نگهبان، خانم مهمانچی و نیز دکتر ایوب مسؤول شرکت در منطقه که در تهیه وسایل و مواد این روش جدید همکاری صمیمانه داشتند، تشکر فراوان ابراز شود.

References :

1- Wonke B. Clinical management of beta thalassemia major. Seminar in Hemato 2001;38(4):350-9.
2- Davenport RD. Pathophysiology of hemolytic transfusion reactions. Semin Hematol 2005;42(3):165-8.
3- Nathan DG, Orkin SH. Nathan and Oski's Hematology of infancy and childhood. 6th edition. Philadelphia: W.B.Saunders Company;2003.
4- Pineda AA, Vamvakas EC, Gorden LD. Trends in the incidence of delayed hemolytic and delayed serologic transfusion reactions. Transfusion 1999; 39(10): 1097-103.
5- Merianou MV, Panousopoulou PL, Lowes PL, Pelegrinis E, Karaklis A. Alloimmunization to red cell antigens in thalassemia: comparative study of usual versus better-match transfusion programmes. Vox Sang. 1987;52:95-98.
6- Spanos T, Karageorga M, Ladis V, Peristeri J, Hatziliami A, Kattamis C. Red cell alloantibodies in patients with thalassemia. Vox Sang 1990;58:50-5.
7- Davenport RD. Management of transfusion reactions. In: Transfusion Therapy: clinical principles and practice. 2nd edition. Bethesda MD, *editor*. American Association of Blood Banks; 2005: 515-35.
8- Brecher ME. American Assocciation of Blood Banks, Technical manual: initial detection and identification of alloantibodies to RBC antigens. 14th edition. 2002: 393-418.
9- Ness PM, Shirey RS, Thoman SK, Buck SA. The differentiation of delayed serologic and delayed hemolytic transfusion reactions: incidence, long-term serologic findings, and clinical significance. Transfusion 1990;30(8):688-93.
10- Giblet ER. Blood group alloantibodies: an assessment of some laboratory practices. Transfusion 1977;17:299-308.
11- Walker RH, Lin DT, Hatrick MB. Alloimmunozation following blood transfusion. Arch Pathol Lab Med 1989;113:254-61.
12- Lapierre Y, Rigal D, Adam J, Josef D, Meyer F, Greber S, *et al*. The gel test: a new way to detect red cell antigen-anti body reactions. Transfusion 1990;30: 109-13.
13- Phillips PK, Whitton CM, Lavin F. The use of the antiglobulin "gel test" for antibody detection. Transfusion Medicine 1992;2:111-3.
14- Bahatti FA, Salamat N, Nadeem A, Shabbir N. Red cell immunization in beta thalassemia major. Journal Coll Physicians Surgerical Pakestan 2004;14:657-60.
15- Ameen R, Al-Shemmari S, Al-Humood S, Chowdhury RI, Al-Eyaadi O, Al-Bashir Al. RBC alloimmunization and autoimmunization among transfusion-dependent Arab thalassemia patients. Transfusion 2003 ; 43 (11) : 1604-10.
16- Norol F, Najahi J, Bachir D, Desaint C. Transfusion and alloimmunization in sickle cell anemia patients. Transfusion Clinical Biology 1994;1:27-34.
17- Spanos T, Karageorga M, Ladis V, Peristeri J, Hatziliami A, Kattamis C. Red cell allo antibodies in patients with thalassemia. Vox Sangunis 1990;58:50-5.
18- Eshghi P, Sanei Moghaddam E, Amir Massoudi M. Allo immunization in major thalassemics in Zahedan in 2001. Mazandaran University of Medical University Journal 2003; 13 (40) : 36–42.

Antibody screening and identification by gel method in thalassemic patients

Azarkeivan A.[1,2](MD), Ahmadi M.H.[3](MS), Gharehbaghian A.[1](PhD), Zolfaghari S.[1](MD), Nasizadeh S.[1](MD), Maghsudlu M.[1](MD), Toolabi A.M.[1](MD), Lotfy P.[1](MS)

[1]Iranian Blood Transfusion Organization- Research Center, Tehran, Iran
[2]Thalassemia Clinic, Tehran, Iran
[3]Ghazvin Medical University, Iran

Abstract

Background and Objectives

Thalassemic patients need regular blood transfusion because of chronic nature of disease. Since just major blood groups are controlled in compatibility tests, formation of antibody against minor blood groups (irregular antibodies) can cause transfusion reactions (delayed hemolytic reaction) and may produce complications for patients. In this study, we decided to perform screening and typing of antibodies with gel method and tried to substitute this modern method for routine tests.

Materials and Methods

In a descriptive study 441 thalassemia patients having referred to two thalassemic centers in Tehran and Ghazvin were studied. Data forms about blood transfusion status were filled out for all patients from whom blood samples were then taken. Screening antibody test with tube method was performed for all patients followed by assessment with gel method according to its standard pattern and respective program. Antibody identification test was performed according to the respective program as well. Results of obtained data from forms filled out by patients were assessed with SPSS 11.5 software; chi-square test was done with 95 % confidence interval.

Results

441 patients consisting of 234 males (53.1%) and 207 females (46.9 %) with the mean age of 22.6 years (SD ± 9.27) participated in the study. Out of the total number of subjects, there are 362 thalassemia major (82.1%) and 79 thalassemia intermedia (17.9%). Screening showed 391 patients (88.7%) without versus 50 (11.3) with alloantibodies. From among identified antibodies, anti-Kell and anti-D were present in 28% and 16% of cases respectively; antibodies to other Rh subgroups including c, C, e, E and Cw appeared in 26% of cases. Comparing results of microtube gel method with tube method for screening shows that 26 patients recognized as positive in gel method were negative in tube method.

Conclusions

Regarding the alloimmunization frequency in thalassemic patients, it is suggested that RBC phenotype especially subgroups of Rh, Kell, Kidd, and Duffy be checked (in addition to ABO Rh(D) group) for every newly diagnosed thalassemia patient; it is further recommended that in every crossmatch for blood transfusion. Blood bag be selected based on Rh subgroups and Kell in conformity with patient phenotype; this would decrease alloimmunization by 90%.

Key words: Screening, Thalassemia, Blood transfusion, Immunization
SJIBTO 2008; 5(2): 99-108
Received: 27 Oct 2007
Accepted: 2 Sep 2008

Correspondence: Azarkeivan A., Pediatric Hematology Oncology. Iranian Blood Transfusion Organization-Research Center.
P.O.Box:14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88074135; Fax : (+9821) 22087853
E-mail: *azazarkeivan@yahoo.com*