

# بکارگیری تکثیر با پرایمر اختصاصی ال، در تشخیص زیر گروه‌های سیستم خونی Rh در بیماران تالاسمی

محمد طاهر حجتی<sup>۱</sup>، دکتر فریبا نباتچیان<sup>۲\*</sup>، دکتر ناهید عین الهی<sup>۳</sup>،  
دکتر علی پور فتح الله<sup>۴</sup>، دکتر محمدرضا مهدوی<sup>۵</sup>

## چکیده

**زمینه و هدف:** تالاسمی یک بیماری ژنتیکی است که بصورت کمبود نسبی یا کامل زنجیره‌های آلفا یا بتا گلوبین می‌باشد. بیماران مبتلا در فرم متوسط و شدید خود از اوایل زندگی احتیاج به تزریق خونهای متعدد پیدا می‌کنند. وقوع آلوایمونیزاسیون در برابر آنتی ژنهای گروههای خونی در مبتلایان به تالاسمی نسبتا بالاست و ممکن است مشکلات زیادی را در درمانهای طولانی مدت و تزریقات بوجود بیاورد. بوجود آمدن آلوآنتی بادی ضد این گروههای خونی موجب پیدایش مشکلات عدیده منجمله آماده کردن خون سازگار برای تزریق می‌شود. لذا تعیین دقیق آنتی ژنهای گلبولهای قرمز این بیماران در کاهش آلوایمونیزاسیون، امری ضروری بنظر می‌رسد.

**روش بررسی:** در این مطالعه، بصورت تصادفی از ۴۰ نفر از بیماران تالاسمی، قبل از اقدام به تزریق خون، ۴ سی سی خون محیطی در لوله های حاوی EDTA گرفته شد. همچنین از ۱۰ نفر از افراد سالم که سابقه هیچ تزریق خون نداشتند هم بعنوان کنترل نتایج سرولوژیکی (آگلوتیناسیون) و مولکولی وارد مطالعه شدند. تعیین فنوتیپ بیماران و گروه کنترل بوسیله گلبولهای قرمز بیماران بروش آگلوتیناسون لوله‌ای طبق دستور بوسیله آنتی بادی های تجاری صورت گرفت. جهت انجام آزمایش مولکولی آزمون Allele Specific Oligonucleotide (ASO) PCR برای هر یک از آنتی ژنهای مورد نظر در میکروتیوب های جداگانه انجام شد.

**یافته‌ها:** در این مطالعه با استفاده از الهای اختصاصی هر ال در شرایط دمایی یکسان هر چهار ژن مورد بررسی تکثیر شد. بعلاوه مقایسه نتایج بدست آمده از دو روش مولکولی و آگلوتیناسیون نشان داد که در گروه شاهد که سابقه هیچگونه تزریق خونی را نداشتند، نتایج مشابهی در دو روش فوتیپی و ژنوتیپی دیده شد، اما در گروه بیماران نتیجه بر خلاف گروه شاهد بود و نتایج این دو روش در بسیاری از نمونه‌ها تفاوت داشت.

**بحث و نتیجه گیری:** مزیت این روش نسبت به روشهای دیگر مثل PCR-RFLP اینست که هر چهار ژن در یک شرایط دمایی و غلظت، قابلیت تکثیر را داشته و بلا فاصله با انجام الکتروفورز تعیین پروفایل آنتی ژنی فرد انجام می‌شود و از طرفی دیگر هزینه و زمان زیادی که در روش PCR-RFLP که در آن پس از تکثیر ژن، محصولات را در مدت خاصی تحت تاثیر آنزیم قرار می‌دهند را ندارد. لذا روش فوق بعلت سادگی روش و ارزیابی نسبت به سایر روشها به مراکز درمانی و تحقیقاتی پیشنهاد می‌گردد.

**واژه های کلیدی:** آزمون ASO-PCR، آزمون RFLP-PCR، گروه خون Rh

\* نویسنده مسؤل :

فریبا نباتچیان ؛

دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی

تهران

Email : fnabatchian@yahoo.com

- دریافت مقاله : مرداد ۸۷ - پذیرش مقاله : دی ۸۷

## مقدمه

تالاسمی یک بیماری ژنتیکی است که بصورت کمبود نسبی یا کامل زنجیره‌های آلفا یا بتا گلوبین می‌باشد. بیماران مبتلا در فرم متوسط و شدید خود از اوایل زندگی احتیاج به تزریق خون متعدد پیدا می‌کنند.

- ۱ کارشناس ارشد هماتولوژی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۲ استادیار گروه علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۳ دانشیار گروه علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۴ استاد گروه ایمنولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
- ۵ مربی گروه علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی مازندران

## روش بررسی

در این مطالعه، بصورت تصادفی از ۴۰ نفر از بیماران تالاسمی (۲۰٪ از مراجعین ماهانه) قبل از اقدام به تزریق خون و ۱۰ نفر از افراد سالم که سابقه هیچ تزریق خون نداشتند (بعنوان کنترل نتایج سرولوژیکی و مولکولی)، مقدار ۴ سی سی خون محیطی در لوله‌های حاوی EDTA گرفته شد. تعیین فنوتیپ بیماران بروش آگلوتیناسون لوله‌ای بوسیله آنتی سرمهای تجاری (CE-IMMUNDIAGNOSTIKA، آلمان) طبق دستور شرکت سازنده صورت گرفت. جهت انجام آزمایش مولکولی، استخراج DNA بوسیله کیت تجاری (KIASorb purification kit، ایالات متحده) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. سپس allele specific oligonucleotide PCR (ASO) برای هر یک از آنتی ژنهای مورد نظر در میکروتیوب‌های جداگانه انجام شد. روش کار بدین صورت بود که برای هر میکروتیوب مقدار ۲۰۰ μM از هر dNTP، ۵ μl بافر ۱۰x، ۱/۵ mM از MgCl<sub>2</sub>، دو واحد از آنزیم Taq پلی مراز (سیناژن، ایران)، ۱ μM از آغازگر (جدول ۱) و ۱ μg از DNA ژنومی ریخته شد. سپس طبق شرایط دمایی ذکر شده در جدول ۲ تکثیر ژنها صورت گرفت در انتها محصولات PCR روی ژل آگارز ۳٪ (Merk، آلمان) مورد آنالیز قرار گرفتند.

تزریق خون منظم برای رشد و نمو بیماران تالاسمی جهت بهبود وضعیت زندگی آنها در طول دوران کودکی قابل اهمیت می‌باشد (۱). وقوع آلوایمونیزاسیون در برابر آنتی ژنهای گروههای خونی در مبتلایان به تالاسمی که بصورت مکرر خون دریافت می‌کنند، نسبتاً بالاست که می‌تواند مشکلات زیادی را در درمانهای طولانی مدت و پیدا کردن واحد خون مناسب برای تزریق به اینگونه بیماران ایجاد کند. در اغلب موارد تعیین صحیح نوع گروه خونی بروش سرولوژیکی در بیمارانی که میزان بالای تزریق خون دارند، بخاطر وجود همزمان گلبولهای قرمز خون دهنده و بیمار در گردش خون بیمار و همینطور مثبت بودن تست کومبس مستقیم، کار بسیار مشکل و وقت گیری می‌باشد (۲-۴). سازگاری دیگر سیستمهای آنتی ژنی مثل C, c, E, e تا زمانی که فرد آلوآنتی بادی علیه آنها نشان ندهد، انجام نمی‌شود، لذا بوجود آمدن آلوآنتی بادی ضد این گروههای خونی موجب پیدایش مشکلات عدیده از جمله آماده کردن خون سازگار برای تزریق می‌شود (۵). از آنجایی که به غیر از آنتی RhD آنتی بادهای دیگری چون آنتی RhC/c و آنتی RhE/e نیز در ایجاد واکنشهای انتقال خون دخیل هستند، شناسایی صحیح زیر گروههای Rh در افراد با تزریقات مکرر خون همچون بیماران تالاسمی، از نظر بالینی جهت کاهش آلوایمونیزاسیون حائز اهمیت می‌باشد (۶).

جدول ۱: توالی پرایمرهای اختصاصی واکنش

Primer name	Sequence 5' to 3'	product size	allele specific
TRH 1	CGCTGCCTGCCCTCTGC	118	C
TRH 2	TTGATAGGATGCCACGAGCC		
TRH 3	CTTGGGCTTCCTCACCTCAAA	107	C
TRH 4	AAGCCGTCCAGCAGGATTGC		
TRH 5	TGGCCACGTGTCAACTCTC	143	E
TRH 7	CATGCTGATCTTCCTTTGGG		
TRH 6	TGGCCACGTGTCAACTCTG	143	E
TRH 7	CATGCTGATCTTCCTTTGGG		

## جدول ۲: شرایط دمایی مورد نیاز برای واکنش

stage	time	Temperature(oC)
Initialization	10 min	94
Denaturation	30 sec	94
30 cycle	Annealing	58
	Extension	72
Final elongation	5 min	72

## یافته ها

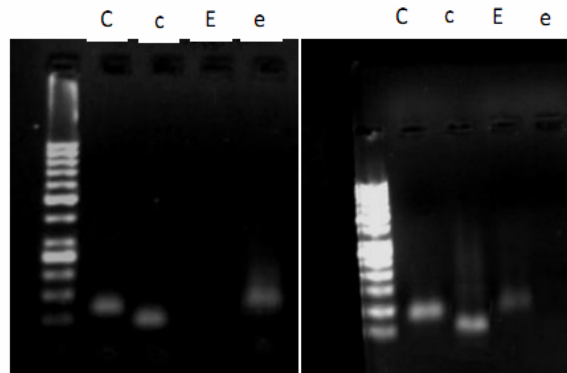
این مقاله مطالعه‌ای جهت تبیین روش مولکولی، جهت کاستن از مشکلات آلوایمونیزاسیون در بیمارانی که ترانسفوزیونهای متعدد دارند مانند بیماران تالاسمی، کم خونی داسی شکل، بیماران سرطانی و... می‌باشد. برای نیل به این منظور از روش Allele-specific oligonucleotide (ASO)-PCR جهت تکثیر ژنهای مربوطه استفاده شد. بدین صورت که برای هر آنتی ژن یک جفت ال مجزا جهت شناسایی محل پلی مرفیسم بصورت Sence و Anti-sence، پس از تایید آن در نرم افزار Blast در سایت NCBI مورد استفاده قرار گرفت (جدول شماره ۳). دلیل شباهت توالی پرایمر TRH5 و TRH6 بجز در نوکلئوتید آخر این است که آخرین نوکلئوتیدی که به ترتیب جهت شناسایی RhE و Rhe طبق جدول ۱ بکار برده شد، به شناسایی نوکلئوتید C از ژن RhE و G از ژن RhCE در جایگاه ۶۷۶ از اگزون ۵ ژن RhCE

می‌پردازد، چراکه پلی مورفیسم در این جایگاه موجب بوجود آمدن یکی از دو ژن می‌گردد. همینطور دلیل یکسان بودن توالی پرایمر TRH7 که بعنوان پرایمر معکوس به کار برده شده را می‌توان به یکی بودن توالیهای پس از بوجود آمدن پلی مورفیسم در این ژن تعمیم داد. در مراحل اولیه راه اندازی این روش علیرغم تناسب غلظت کلیه مواد و محلولها، بانندی دال بر تکثیر ژنهای مورد نظر مشاهده نشد. برای حل این مشکل دمای واسرشت را از ۶۳ درجه که در مطالعات مشابه بکار گرفته شده بود، بتدریج کم نموده که در نهایت در دمای ۵۸ درجه ژن‌ها تکثیر شدند (شکل ۱). مقایسه نتایج بدست آمده از این دو روش نشان داد که در گروه شاهد که سابقه هیچگونه تزریق خون را نداشتند، نتایج مشابهی در دو روش فوتیپی و ژنوتیپی دیده شد. اما در گروه بیماران نتیجه برخلاف گروه شاهد بود و نتایج این دو روش در بسیاری از نمونه‌ها تفاوت داشت (جدول ۴).



جدول ۴ : نتایج آزمایشات انجام شده بر روی کلیه نمونه‌ها (مرف T نشان‌دهنده بیماران تالاسمی، مرف C نشانگر گروه کنترل، مرف P نشانه وجود و مرف N نشان‌دهنده عدم وجود آنتی ژن مورد نظر در نمونه مورد آزمایش می‌باشد)

	Genotyping					Phenotyping				
	C	c	E	e		C	c	E	e	
C 1	P	P	N	P	Ccee	P	P	N	P	Ccee
C 2	P	N	P	P	CCeEe	P	N	P	P	CCeEe
C 3	P	P	P	P	CcEe	P	P	P	P	CcEe
C 4	P	N	P	P	CCeEe	P	N	P	P	CCeEe
C 5	P	P	P	P	CcEe	P	P	P	P	CcEe
C 6	N	P	P	N	ccEE	N	P	P	N	ccEE
C 7	P	N	P	P	CCeEe	P	N	P	P	CCeEe
C 8	P	P	P	P	CcEe	N	P	P	P	ccEe
C 9	P		P	N	CCEE	P	N	P	N	CCEE
C 10	P	P	P	N	CceEE	P	P	P	N	CcEE
T1	P	P	P	P	CcEe	P	N	P	P	CCeEe
T2	P	P	P	N	CcEE	P	P	P	P	CcEe
T3	P	P	P	P	CcEe	P	P	P	P	CcEe
T4	P	P	N	P	Ccee	P	P	P	N	CcEE
T5	P	N	P	P	CcEe	P	N	P	N	CCEE
T6	P	P	P	N	CcEE	N	P	N	P	ccee
T7	P	P	P	P	CcEe	P	P	P	N	CcEE
T8	P	P	N	P	Ccee	P	P	P	P	CcEe
T9	P	P	P	P	CcEe	P	P	P	P	CcEe
T10	P	P	P	N	CcEE	P	P	P	P	CcEe
T11	P	N	P	N	CCEE	P	P	N	P	Ccee
T12	N	P	N	P	ccee	P	N	P	P	CCeEe
T13	P	P	P	N	CcEE	P	P	P	P	CcEe
T14	P	P	P	P	CcEe	N	P	P	P	ccEe
T15	P	P	P	P	CcEe	P	N	P	N	CCEE
T16	P	P	N	P	Ccee	P	P	N	P	Ccee
T17	P	P	P	P	CcEe	P	N	N	P	CCee
T18	P	P	P	P	CcEe	P	N	P	P	CCeEe
T19	P	P	N	P	Ccee	P	P	P	N	CcEE
T20	P	P	P	P	CcEe	P	N	P	P	CCeEe
T21	P	P	N	P	Ccee	P	P	P	P	CcEe
T22	P	P	P	P	CcEe	P	N	P	N	CCEE
T23	P	N	P	N	CCEE	P	N	P	N	CCEE
T24	P	P	P	P	CcEe	P	P	P	P	CcEe
T25	P	P	N	P	Ccee	P	P	N	P	Ccee
T26	P	N	P	N	CCEE	P	P	P	P	CcEe
T27	P	P	N	P	Ccee	P	N	P	N	CcEe
T28	P	N	N	P	CCee	P	N	P	P	CCeEe
T29	P	N	P	P	CCeEe	N	P	P	P	ccEe
T30	P	N	P	N	CCEE	P	P	P	N	CcEE
T31	P	N	P	P	CCeEe	P	P	P	P	CcEe
T32	P	P	P	P	CcEe	P	N	N	P	CCee
T33	N	P	P	P	ccEe	P	P	P	N	CcEE
T34	P	P	P	N	CcEE	P	N	P	P	CCeEe
T35	P	N	P	P	CCeEe	P	P	P	P	CcEe
T36	P	P	P	P	CcEe	P	N	P	N	CCEE
T37	P	P	N	P	Ccee	P	N	P	P	CCeEe
T38	P	N	P	P	CCeEe	P	P	P	P	CcEe
T39	P	P	P	P	CcEe	P	P	P	P	CcEe
T40	N	P	P	P	ccEe	P	P	N	P	Ccee



شکل ۱: سمت چپ مربوط به بیمار T25 با ترکیب Ccee و سمت راست مربوط به بیمار T13 با ترکیب CcEE

### بحث و نتیجه گیری

امروزه تکنولوژی استفاده از DNA موجب تشخیص مولکولی بسیاری از آنتی ژنهای گروههای خونی شده است. بسیاری از پلی مورفیسمهای گروههای خونی بواسطه جهشهای نقطه‌ای در ژنهای کد کننده این آنتی ژنها ایجاد می‌شود. این دانش موجب تعیین و پیشگویی پروفایل گروههای خونی در افراد می‌گردد که می‌تواند موجب غلبه بر مشکلات و محدودیتهای استفاده از روشهای آگلوتیناسیون گردد (۷-۸). از مسائل مهم و سوال برانگیز در این روش اینست که آیا استفاده از DNA استخراج شده از گلبولهای سفید این افراد با گلبولهای سفید موجود در واحدهای خونی می‌تواند موجب ایجاد اختلاف در نتیجه نهایی گردد؟ اما مطالعات صورت گرفته در این زمینه نشان داد که حتی استفاده از گلبولهای سفید افرادی که به تازگی خون دریافت کرده اند نیز نتایج کاملاً قابل قبولی را در بردارد (۹-۱۰). از طرفی، یافتن روشهای کم هزینه و آسان جهت انجام آزمایشات مولکولی نیز می‌تواند میزان کاربرد آنها افزایش دهد. جهت نیل به این هدف شناخت کامل خصوصیات ژنهای هدف در تبیین روش مناسب برای آزمایشات بسیار مهم می‌باشد. اللهای RHC و RHc، جهشهای نقطه‌ای در ژن RHCE در موقعیتهای باز ۴۸ از اگزون یک و بازهای ۱۵۰، ۱۷۸، ۲۰۱، ۲۰۳ و ۳۰۷ از اگزون دو

موجب تفاوت ژن RHC نسبت به RHc می‌گردد (۱۱). جابجایی این شش نوکلئوتید موجب تغییر در ۴ اسید آمینه می‌گردد که در این میان اسید آمینه شماره ۱۰۳ بعلت قرار گرفتن در ناحیه بیرونی پروتئین مربوطه حائز اهمیت می‌باشد. اما پلی مورفیسم در نوکلئوتید شماره ۳۰۷ موجب تظاهر فنوتیپ RHc می‌گردد (۱۲). درحالیکه تفاوت بین دو الل RHE و RHe از جانشینی نوکلئوتید C بجای G در جایگاه ۶۷۶ در اگزون ۵ از ژن RHCE ناشی می‌گردد که در آن پرولین به آلانین تبدیل می‌شود (۱۱). با توجه به شناخته شدن جایگاههای جهشهای تاثیر گذار در بوجود آمدن این پلی مورفیسمها، تلاشهای زیادی در طراحی و اجرای روش مناسب ژنوتیپینگ گروه خونی Rh صورت گرفت. همولوژی بسیار بالایی در توالیهای ژن RhD و RhC در توالی آنها دیده می‌شود، بطوریکه تفاوت آنها را میتوان در نوکلئوتید ۴۸ از اگزون یک ژن RHCE مشاهده نمود. به همین جهت «تاناکا» و همکاران (۲۰۰۱) جهت تعیین دقیق وجود ژنهای مربوطه به تعیین توالی در پروموتور ژن RHCE پرداختند و آنها را با توالیهای گزارش شده قبلی مقایسه کردند. این مقایسه نشان داد که نوکلئوتید ۲۴۶۸ در ناحیه پروموتور ژنهای RHD و RHCE و نوکلئوتید ۲۲۹۲ در ژنهای RhC و Rhc با هم متفاوت هستند و بر

نشان داده شد که بیشترین میزان تفاوت در بین گروههای خونی، در گروه خونی Rh وجود دارد که با توجه به پلی مورفیسم بالای آن، اهمیت بررسی دقیق این گروه خونی را بیش از پیش تاکید می‌کند. نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان داد روشهای سرولوژیکی در تعیین صحیح گروههای خونی افرادی که تزریقات خونی متعددی دارند روش مناسبی به حساب نمی‌آید و دارای تفاوتهایی با روش مولکولی می‌باشد، در حالیکه در گروه کنترل که سابقه هیچگونه تزریق خونی نداشتند نتایج دو روش کاملاً یکسان بوده که با نتایج بدست آمده در این طرح کنونی مطابقت داشت و عدم توانایی گروه بندی سرولوژیکی را در تعیین دقیق گروههای خونی در بیماران تالاسمی و کارآمدی روش مولکولی را در این رابطه ثابت نمود(۱۶).

در تحقیق کنونی از روش Allele-Specific Oligonucleotide (ASO) جهت تشخیص ژنهای C، E، e استفاده شد. چهار جفت آغازگر اختصاصی جهت شناسایی هر یک از ژنها با توجه به جایگاههای دارای تفاوت، بکار برده شد. مزیت این روش نسبت به روشهای PCR-RFLP اینست که هر چهار ژن در یک شرایط دمایی و غلظت، قابلیت تکثیر را داشته و بلافاصله با انجام الکتروفورز قادر به تعیین پروفایل آنتی ژنی فرد وجود دارد و از طرف دیگر هزینه و زمان زیادی را که در روش PCR-RFLP که در آن پس از تکثیر ژن، محصولات را در مدت خاصی تحت تاثیر آنزیم قرار می‌دهند را ندارد. لذا روش فوق بعلاوه سادگی روش و ارزانی نسبت به سایر روشها به مراکز درمانی و تحقیقاتی پیشنهاد می‌گردد.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل یک طرح تحقیقاتی در قالب پایان نامه مصوب در دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم

همین اساس جهت تمایز ژنهای C و C اقدام به طراحی روش PCR-RFLP نمودند که آنرا بواسطه روشهای قبلی مورد بررسی قرار دادند که نتیجه امر کاملاً بیانگر صحت روش طراحی شده آنها در ژنوتیپینگ ژنهای فوق بود(۱۳). در روشی دیگر «فاس» و همکاران (۱۹۹۵) با تکیه بر تفاوت نوکلئوتیدی در جایگاه ۶۷۶ از ژن RHCE که در بروز آنتی ژنهای E و e موثر بودند اقدام به طراحی آغازگر اختصاصی جهت انجام Allele Specific Primer Amplification (ASPA) نمودند، بطوریکه آغازگر Sence طراحی شده برای تشخیص ژن E در ناحیه ۶۷۶ قادر به شناسایی نوکلئوتید سیتوزین دار و آغازگر Sence طراحی شده برای تشخیص ژن e در ناحیه ۶۷۶ قادر به شناسایی نوکلئوتید گوانین دار بود. این گروه با بررسی ژنوتیپی بر روی نمونه ۱۵۸ فرد سالم صحت روش خود را اثبات نمودند(۱۴). نتایج مطالعه انجام شده توسط «کاستیلو» و همکاران (۲۰۰۲) که با بررسی ۱۰ بیمار بتا تالاسمی آلوایمونیزه شده از نظر فنوتیپی و ژنوتیپی که بروش PCR-RFLP صورت گرفت نشان داده شد که در ۹ مورد از ۱۰ مورد، فنوتیپ و ژنوتیپ بیماران متفاوت بود که با نتایج بدست آمده در مطالعه ما از نظر عدم همسان بودن آزمایشات فنوتیپی و ژنوتیپی در بیماران تالاسمی مشابهت داشت. این محققین با توجه به یافته فوق به این نتیجه رسیدند که بررسی ژنوتیپی گروههای خونی موجب ایجاد تسهیلاتی در امر انتقال خون در بیماران بتا تالاسمی و دیگر بیماران دارای تزریقات خون متعدد می‌گردد و پیش بینی کردند که در آینده نزدیک، تکنیکی رایج در امر تعیین گروههای خونی ایجاد خواهد شد(۱۵). در مطالعه دیگر انجام شده توسط «شایگان» و همکاران (۲۰۰۸) که بروش PCR-RFLP بر روی ۴۴ بیمار تالاسمی و ۲۰ فرد سالم که سابقه هیچگونه انتقال خونی را نداشتند،

پزشکی تهران می‌باشد که کلیه مراحل کاری آن در آزمایشگاه دانشکده پیراپزشکی صورت گرفت. لذا بدین وسیله از زحمات کلیه مسئولین و کارشناسان آن آزمایشگاه تشکر و قدردانی می‌شود.

## منابع

1. Richard A. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Twenty first ed. ELSEVIER; 2007.
2. Castro O, Sandler SG, Ranas HY. Predicting the effect of transfusing only phenotype-matched RBCs to patients with sickle cell disease: theoretical and practical implications. *Transfusion* 2002 ; 42(6): 684-90.
3. Richard lee G. Wintrob's Clinical Hematology. 10<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams & wilkins; 1999. P 830-832.
4. HK H, SY H. Alloimmunization in Hong Kong Southern Chinese transfusion dependent thalassemia patients. *Blood* 2001; 97(12): 3999-4000.
5. Singer ST, Wu V, Mignacca R, Kuypers FA, Morel P, Vichinsky EP. Alloimmunization and erythrocyte autoimmunization in transfusion-dependent thalassemia patients of predominantly Asian descent. *Blood* 2000; 96: 3369-3373.
6. Reid ME, Yazdanbakhsh K. Molecular insights into blood groups and implications for blood transfusions. *Curr Opin Hematol* 1998; 5: 93-102.
7. Avent ND. Human erythrocyte antigen expression: its molecular bases. *Br J Biomed Sci* 1997; 54: 16-37.
8. Pellegrino Jr J, Castilho L, Rios M, De Souza CA. Blood group genotyping in a population of highly diverse ancestry. *J Clin Lab Anal* 2001; 15: 8-13.
9. Lee TH, Donegan E, Slichter S, Bush MP. Transient increase in circulating donor leucocytes after allogeneic transfusions in immunocompetent recipients compatible with donor cell proliferation. *Blood* 1995; 85: 1207-1214.
10. Lee TH, Paglieroni T, Ohro H, Holland PV, Bush MP. Longterm multi-lineage chimerism of donor leucocytes in transfused trauma patients. *Blood* 1996; 88: 265.
11. Mouro I, Colin Y, Cherif-zahar B, Cartron JP, Vab Kim C. Molecular genetic basis of human Rh blood group system. *Neture Genet* 1993; 5 : 62-65.
12. Vab Kim C, Mouro I, Colin C, Brossaed Y, Cartron JP. PCR based determination of Rhc and RhE status of fetuses at risk of Rhc and RhE haemolytic disease. *BJH* 1994; 88: 193-195.
13. Tanaka M, Naoko Yamashita N, Takahashi J, Hirayama F, Kajii E, Yoshihiko T. RHC/c genotyping based on polymorphism in the promoter region of the RHCE gene. *Legal Medicine* 2001; 3: 205-212.
14. Schoot D, Faas BH, Simsek S, Bleeker PM, Overbeeke MA, Cuijpers HT, et al. Rh E/e genotyping by allele-specific primer amplification. *Blood* 1995; 85: 829-832.
15. Castilho L, Rios M, Pellegrino Jo, Sara TO, Saad L, Costa1 FF. Blood Group Genotyping Facilitates Transfusion of b-Thalassemia Patients. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 2002; 16: 216-220.
16. Shayegan M, Samei S, Azarkeyvan A, Daniels J, Peter M, Atayi Z. Molecular genotyping of blood groups in patients with thalassemia in thalassemia clinic for adults in Tehran. *Blood Quarterly* 2008; 6(2): 107-115 [Article in persian].