غربالگری سندرم‌های تالاسمی آلفا با استفاده از روش‌های الیزا و کروماتوگرافی نواری

• دکتر حبیب ا... گل افشان
عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی شیراز
golafshanh@sums.ac.ir

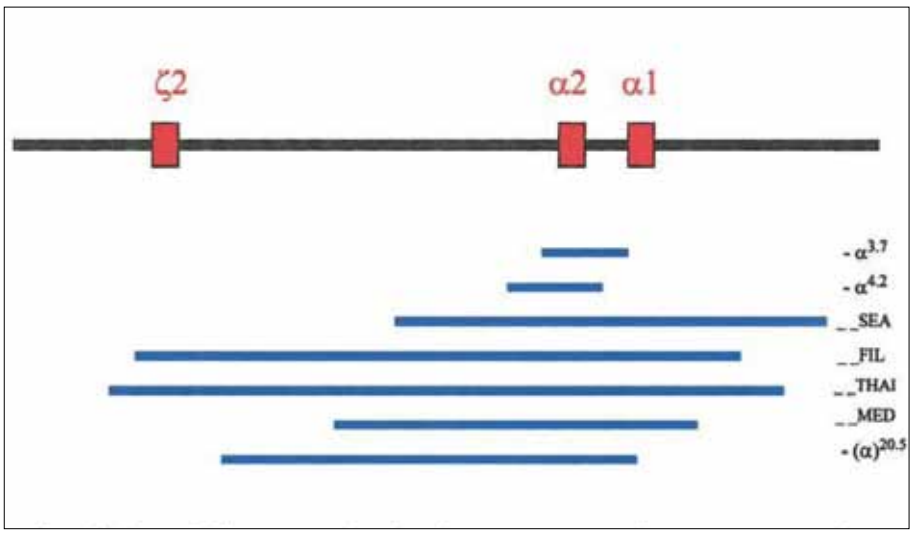
• عباس یار محمدی
کارشناس ارشد آزمایشگاه دانشگاه علوم پزشکی شیراز

• رضا رنجبران
دانشجوی دکترای تخصصی خون شناسی

مرکز تحقیقات علوم و فن آوری تشخیص آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی شیراز

تالاسمی آلفا شایع ترین اختلال ژنتیکی در تولید هموگلوبین و ناشی از کاهش تولید زنجیره‌های گلوبین آلفا است. سندرم‌های تالاسمی آلفا به طور شایع ناشی از حذف ژن گلوبین آلفا و در مواردی ناشی از جهش‌های غیر حذفی می‌باشد. هر شخص سالم دارای ٤ ژن آلفا (دو عدد روی هر هاپلوتایپ کروموزوم ١٦) می‌باشد. بر اساس تعداد ژن‌های حذف شده، چهار حالت بالینی مختلف ایجاد می‌شود. حذف یک، دو، سه و چهار ژن آلفا به ترتیب موجب بروز فنوتایپ‌های ناقل خاموش، تالاسمی مینور آلفا، بیماری هموگلوبین اچ و هیدروپس فتالیس با هموگلوبین بارت می‌شود. اگر چه ناقل خاموش و تالاسمی مینور آلفا علایم بالینی حائز اهمیتی ندارند اما فرم‌های بالینی شدید تالاسمی آلفا (بیماری هموگلوبین اچ و هیدروپس فتالیس) به دنبال ازدواج فنوتیپ‌های فاقد علائم ایجاد می‌شوند (١). علاوه بر این، تالاسمی مینور آلفا از نظر پارامترهای هماتولوژیک شباهت زیادی با تالاسمی مینور بتا دارد و در مواردی نمی‌توان با اندازه گیری هموگلوبین A2 این دو را از هم افتراق داد.

کلمات کلیدی: تالاسمی آلفا، الیزا، کروماتوگرافی



شکل ١. در شکل هاپلوتایپ‌های شایع خوشه ژن‌های آلفا و انواع حذف‌های شایع ژن آلفا مشاهده می‌شود. نوارهای آبی وسعت ناحیه حذف شده را نشان می‌دهد. چنانچه هر دو ژن آلفای مجاور حذف شود به آن حذف سیس گفته می‌شود مانند حذف سیس SEA __ و یا حذف MED __ . علایم منفی به مفهوم حذف هر دو ژن آلفا است. شایع ترین حذف‌های تک نی آلفا ژنوتایپ‌های $\alpha^{3.7}$ و $\alpha^{4.2}$ است.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-05-17]

علیرغم اهمیت بالای افتراق ناقلین تالاسمی مینور بتا از آلفا به خصوص در برنامه غربالگری تالاسمی قبل از ازدواج به دلیل پیچیدگی و گران قیمت بودن و در دسترس نبودن روش‌های مولکولی، هنوز روش غربالگری مناسب در دسترس نیست.

در حال حاضر جهت شناسایی و تایید حذف ژن‌های گلوبین آلفا از روش مولکولی Gap ـ PCR استفاده می‌شود (۲) که با توجه به هزینه بالا و وقت گیر بودن و پیچیدگی نمی‌تواند روش مناسب جهت غربالگری باشد. همچنین روش آنالیز نسبت سنتز زنجیره‌های گلوبین نیز دارای معایبی است که علاوه بر محدودیت‌های بالا، نیاز به تجهیزات گران قیمت و مواد رادیو اکتیو دارد و موجب شده که این تست تنها در آزمایشگاه‌های تخصصی محدودی انجام شود.

از این رو معرفی یک تست سریع و مناسب که قادر به تشخیص موارد مشکوک تالاسمی آلفا و افتراق آن از موارد هماتولوژیک مشابه باشد، می‌تواند در تشخیص و همچنین غربالگری ناقلین قبل از ازدواج کمک کننده باشد.

روش الیزا یک روش ساده و ارزان قیمت با حساسیت و اختصاصیت بالا است که امکان انجام آن در بسیاری از آزمایشگاه‌های تشخیصی وجود دارد. در سال‌های اخیر به دو صورت از روش الیزا در غربالگری و تشخیص سندرم‌های تالاسمی آلفا استفاده شده است.

۱- جهت تشخیص حضور زنجیره گلوبین رویانی زتا (ξ) در گلبول‌های قرمز افراد بالغ

۲- جهت تشخیص حضور هموگلوبین بارت(γ4) در گلبول‌های قرمز افراد بالغ

گلوبین زتا یک زنجیره گلوبین شبیه به زنجیره آلفا است که در دوران رویانی و اوایل دوران جنینی (تا سه ماهگی دوران جنینی) تولید می‌شود و در اواخر دوران جنینی تا پایان زندگی سنتز آن متوقف و توسط رشته گلوبین آلفا جایگزین می‌شود. بنابراین این انتظار وجود دارد که در مواردی که حذف ژن‌های آلفا وجود دارد، ژن گلوبین زتا بتواند تا حدی به صورت جبرانی بیان شود. در برخی از مطالعات از تشخیص حضور رشته‌های گلوبین زتا به روش الیزا در غربالگری تالاسمی آلفا مورد استفاده قرار گرفته است.

نتایج نشان داده است که حضور قابل ملاحظه این گلوبین در خون ناقلین با حذف سیس آلفای جنوب شرقی آسیا (αα / ـ ـ SEA) مشاهده شده و این روش جهت غربالگری ناقلین با حذف SEA ـ ـ مورد تائید قرار گرفته است و ارزش تشخیصی آن برای سایر انواع حذف‌ها هنوز به طور دقیق مورد مطالعه قرار نگرفته است. هر چند که مطالعه انجام شده بر روی تعداد محدودی از افراد دارای حذفMED(αα/ MED ـ ـ) نتایج مثبت نشان داده است. در سایر حذف‌های آلفا مانند ($-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$)، ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$) و حتی ژنوتایپ (αα/αα) نتایج به دست آمده بسیار متغیر بوده است.

مکانیسم مولکولی افزایش زنجیره گلوبین زتا در حذف SEA ـ ـ تا کنون مشخص نشده است اما این فرضیه وجود دارد که ممکن است این نوع حذف سبب نزدیک شدن ژن زنجیره گلوبین زتا به توالی‌های افزاینده (Enhancer sequences) شده و بیان آن افزایش یابد. در واقع این فرضیه بر اساس الگویی که در تداوم سنتز ارثی هموگلوبینF (HPFH) در برخی از حذف‌های توام ژن بتا و دلتا اتفاق می‌افتد، شکل گرفته است (۳و ٤).

بررسی‌ها نشان داده است که استفاده از روش الیزا در تشخیص زنجیره زتا همراه با آزمایش اچ بادی (حتی با یافتن یک توپ گلف به ازای ۱۰۰/۰۰۰ گلبول قرمز) دارای حساسیت ۹۲ ٪ و اختصاصیت ۹۷ ٪ در تشخیص تالاسمی α^0 می‌باشد. همچنین مطالعات نشان داده است که شایع ترین علت هیدروپس فتالیس از ازدواج فنوتایپ‌های حذف α^0 به ویژه از نوع SEA ـ ـ می‌باشد، بنابراین از این روش در صورت مثبت شدن می‌توان در غربالگری قبل از ازدواج، جهت کاهش تولد نوزاد مبتلا به جنین هیدروپس بهره برد (۳).

هموگلوبین بارت، هموگلوبینی است که از چهار زنجیره همگون گاما (γ4) تشکیل شده است. این هموگلوبین در خون نوزادان تازه متولد شده که دارای حذف‌های ژن گلوبین آلفا هستند به روش الکتروفورز هموگلوبین قابل تشخیص می‌باشد اما پس از ۳ تا ٦ ماه مقدار آن کاهش یافته و در الکتروفورز هموگلوبین مشاهده نمی‌شود.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-05-17]

Genotype	Hemoglobin Bart's level
Normal	0
Silent carrier	0 - 2 %
Alpha thalassemia trait	5 - 10 %
Hemoglobin H disease	25 - 40 %
Hydrops fetalis	80% (with 20 % Hgb Portland)

جدول ۱. سطح هموگلوبین بارت در نوزادان تازه متولد شده در انواع سندرم‌های تالاسمی آلفا با استفاده از روش الکتروفورز

در سال ۲۰۰۹ مطالعه‌ای توسط Luksana Makonkawkeyoon و همکاران انجام گرفت که در آن با استفاده از آنتی بادی اختصاصی علیه هموگلوبین بارت (γ4) که قادر به واکنش با زنجیره گامای موجود در هموگلوبین F نمی‌باشد، مقدار هموگلوبین بارت را در انواع مختلف تالاسمی‌های آلفا در بالغین به روش الیزا اندازه گیری کردند، که اختلاف نتایج به دست آمده در این افراد با افراد نرمال کاملا معنا دار بود. میانگین مقادیر هموگلوبین بارت به دست آمده در گروه‌های مختلف در جدول زیر نشان داده شده است:

Subjects	Hb Bart's (ng/mL)
Normal adult	0
α^0 thalassemia	967±438
Deletional HbH disease	1.537±339
HbH disease with HbCS	1.268±284
Nondeletional α^+ thalassemia	712±420
Deletional α^+ thalassemia	318±221

جدول ۲. میانگین سطح هموگلوبین بارت در جمعیت بالغین مورد مطالعه به روش الیزا

لازم به یادآوری است که این اندازه گیری در افراد بالغ و کودکان انجام گرفت، هر چند که تا قبل از این مطالعه عقیده بر این بوده است که این نوع هموگلوبین فقط در خون نوزادان تا ٦ ماهگی وجود دارد و پس از آن غیر قابل اندازه گیری می‌شود، اما نتایج این مطالعه نشان داد که علت غیر قابل تشخیص بودن آن، پایین بودن حساسیت روش‌های مورد استفاده بوده است، زیرا حساسیت روش الیزا به نسبت روش‌های الکتروفورز بسیار بالاتر است (۵).

روش الیزا یک روش مطمئن، آسان و در دسترس است که امکان غربالگری تعداد زیادی از نمونه‌ها را فراهم می‌کند. همچنین اندازه گیری مقدار هموگلوبین بارت در خون افراد با استفاده از روش الیزا نسبت به اندازه گیری زنجیره گلوبین زتا به روش الیزا در غربالگری سندرم‌های آلفا تالاسمی کاربردی تر می‌باشد. علاوه بر این که با استفاده از این روش همچنین می‌توان انواع مختلف تالاسمی‌های آلفا را نیز با توجه به سطح هموگلوبین بارت از یکدیگر افتراق داد.

در سال ۲۰۰۹ براساس نظریه حضور قابل تشخیص هموگلوبین بارت در افراد ناقل تالاسمی یک تست ایمونوکروماتوگرافی نواری (Immunochromatographic(IC) strip test) با استفاده از آنتی بادی منوکلونال علیه γ4 توسط Chatchai Tayapiwatana و همکاران ارائه گردید (٤).

این نوار از ٤ قسمت اصلی تشکیل شده است:

۱- ناحیه مربوط به نمونه گذاری

۲- بالشتک (Pad) حاوی آنتی بادی موشی علیه هموگلوبین بارت کونژوگه شده با Colloidal gold

۳- کاغذ نیتروسلولز

٤- بالشتک جذب کننده

بر روی کاغذ نیتروسلولز نیز دو ناحیه مجزا وجود دارد:

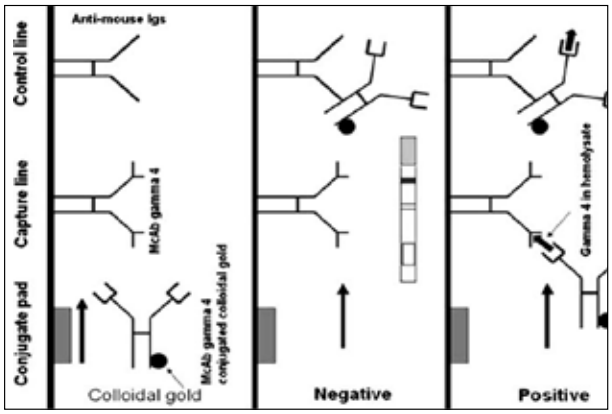
Capture line: این ناحیه با آنتی بادی منوکلونال غیرکانژوگه علیه هموگلوبین بارت آغشته شده است.

Control line: این ناحیه با آنتی بادی علیه Fc مولکول ایمونوگلوبین موش آغشته شده است.

با انتشار همولیزات بر روی نوار و آزاد شدن آنتی بادی منوکلونال کانژوگه از بالشتک (pad)، واکنش ساندویچی شکل می‌گیرد. بدین مفهوم که مولکول‌های هموگلوبین بارت توسط آنتی بادی کونژوگه و آنتی بادی غیر کونژوگه که به کاغذ نیترو سلولز چسبیده است به دام افتاده و در ناحیه Capture line ایجاد باند می‌کند، بخشی از آنتی بادی کونژوگه نیز از طریق ناحیه Fc با Anti mouse IgG (آنتی بادی علیه IgG تهیه شده از موش) در ناحیه Control line واکنش داده و ایجاد یک نوار دیگر می‌کند.

بنابراین مشاهده ۲ نوار گویای حضور هموگلوبین بارت و مشاهده یک خط در ناحیه کنترل گویای رها شدن آنتی بادی کونژوگه از بالشتک و فقدان هموگلوبین بارت می‌باشد (٤).

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-05-17]



شکل ۲. نمایی شماتیک از اساس تست نواری ایمونوکروماتوگرافی برای تشخیص هموگلوبین بارت

حساسیت و اختصاصیت به دست آمده برای این روش در مقایسه با روش PCR به عنوان روش استاندارد طلایی به ترتیب ۱۰۰ ٪ و ۸۶ ٪ می‌باشد.

نتایج مربوط به غربالگری انواع تالاسمی‌های آلفا با استفاده از این روش در جدول زیر نشان داده شده است.

Phenotype	Sample no.	PCR and Hb typing		IC strip test	
		DNA analysis	Hb typing	Positive	Negative
α-Thalassaemia 1 heterozygote	75	$^{SEA}/\alpha\alpha$	A_2A	75	0
α-Thalassaemia 1 heterozygote with β-thalassaemia heterozygote	2	$^{SEA}/\alpha\alpha$	A_2A	2	0
α-Thalassaemia 1 heterozygote with Hb E heterozygote	12	$^{SEA}/\alpha\alpha$	EA	12	0
α-Thalassaemia 1 heterozygote with Hb E homozygote	1	$^{SEA}/\alpha\alpha$	EE	1	0
Hb H disease and Hb H-CS disease	44	$^{SEA}/^{3.7}\alpha$	A_2A, Bart's, H	44	0
CSEA Bart's disease	11	$^{SEA}/\alpha\alpha^{CS}$	CSEA Bart's	11	0
α-Thalassaemia 2 homozygote	7	$\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$	A_2A	7	0
α-Thalassaemia 2 homozygote with Hb E heterozygote	1	$\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	EA	1	0
α-Thalassaemia 2 homozygote with Hb E homozygote	1	$\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	EE	1	0
α-Thalassaemia 2 heterozygote	31	$\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$	A_2A	27	4
α-Thalassaemia 2 heterozygote with Hb E heterozygote	9	$\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	EA	6	3
α-Thalassaemia 2 heterozygote with β-thalassaemia heterozygote	1	$\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$	A_2A	1	0
β-Thalassaemia heterozygote	39	–	A_2A	1	38
β-Thalassaemia/HbE and β-thalassaemia homozygote	43	–	EFA, EF	11	32
Hb E heterozygote	57	αα/αα	EA	0	57
Hb E homozygote	25	–	EE	0	25
Normal	233	αα/αα	A_2A	6	227
Total	592			206	386

جدول ۳. تشخیص حضور هموگلوبین بارت در افراد نرمال و تالاسمی‌های آلفا با استفاده از روش ایمونوکروماتوگرافی نواری

References

1- Galanello R, and Cao A. Alpha-thalassemia. Genetics IN Medicine. 2011, 13: 83-88.

2- Zhou YQ, Xiao GF, Li LY, Li WD, Liu ZY, Zhu LF, Mo QH, Qu XJ, Xu XM. Evaluation of clinical application of gap-PCR as a routine method for alpha-thalassemia carrier detection. Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao. 2002; 22(5):434-6.

3- Lafferty JD, Barth DS, Sheridan BL, McFarlane AG, Halchuk LM, Raby A, and Crowther MA. A Multicenter Trial of the Effectiveness of ζ-Globin Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Hemoglobin H Inclusion Body Screening for the Detection of α0-Thalassemia Trait. Am J Clin Pathol. 2008, 129:309-315.

4- Tayapiwatana C, Kuntaruk S, Tatu T, Chiampanichayakul S, Munkongdee T, Winichagoon P, Fuchareon S, Kasinrerk W. Simple method for screening of α -thalassaemia 1 carriers. Int J Hematol. 2009, 89:559–567.

5- Makonkawkeyoon. L, Pharephan. S, Tuntiwechapikul. W and Makonkawkeyoon. S. Application of Monoclonal and Polyclonal Antibodies to Hb Bart's for the Detection of α Thalassemias. The Open Hematology Journal. 2009, 3, 11-17.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-05-17]