Archive of SID

خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۳ شماره ۱ بهار ۹۵ (۲۸-۱۹)

مقاله پژوهشی

تعیین ژنوتیپ RHD جنین در مادران RhD منفی با استفاده از Real Time PCR

محمد حسین احمدی[۱]، ناصر امیری‌زاده[۲]، صدیقه حنطوش‌زاده[۳]، محمد علی اخوت[۴]، محمد صیادی[۱]،

امیر ولی‌خانی[۱]، آزیتا آذرکیوان[۵]

چکیده

سابقه و هدف

آنتی‌ژن RhD ، نقش مهمی را در ایجاد بیماری همولیتیک جنین و نوزاد ایفا می‌کند. هدف از انجام این مطالعه، تعیین ژنوتیپ RhD جنین در پلاسمای مادران RhD منفی و هم چنین تعیین جنسیت جنین در هفته‌های نخست بارداری با استفاده از روش Real Time PCR بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی، ۲۱ نمونه DNA ، از پلاسمای مادران باردار RhD منفی که در سنین بارداری بین ۸ تا ۳۹ هفته قرار داشتند استخراج و در مورد هر یک از آن‌ها، ژن‌های بتا گلوبین، SRY و اگزون‌های ۵، ۷ و ۱۰ از ژن *RHD* با استفاده از روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل از آن با نتایج فنوتیپی نوزاد مقایسه گردید. یافته‌ها توسط آزمون‌های کای‌دو و کوهن و نرم‌افزار SPSS ۲۲ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

۱۱ مورد(۵۲/۴٪) از نوزادان جنس مذکر داشتند که در ۱۰ مورد(۹۱٪) از آن‌ها فنوتیپ RhD مثبت و در یک مورد(۹٪) منفی گزارش شد. هم چنین ۱۰ مورد(۴۷/۶٪) از نوزادان جنس مؤنث داشتند که ۹ مورد(۹۰٪) فنوتیپ RhD مثبت و یک مورد(۱۰٪) RhD منفی گزارش گردید. این نتایج با نتایج ژنوتیپی به دست آمده از اگزون‌های RHD و SRY مطابقت کامل داشت.

نتیجه گیری

نتایج نشان داد که بررسی ژنوتیپ RHD جنین را می‌توان با استفاده از پلاسمای مادر و به کارگیری روش RT-PCR با حساسیت و اختصاصیت بالا انجام داد. این روش کمک شایانی به مادران باردار RhD منفی در مورد به کارگیری صحیح از ایمونوگلوبولین D و هم چنین در مورد مدیریت و جلوگیری از بروز بیماری همولیتیک جنین و نوزاد می‌کند.

کلمات کلیدی: غربالگری قبل از تولد، سیستم گروه خونی Rh ، بررسی تعیین جنسیت، روش‌های تعیین ژنوتیپ Real-Time PCR

تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۳۱
تاریخ پذیرش: ۹۴/۹/۱۰

۱ـ کارشناس ارشد خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۲ـ PhD خون‌شناسی و بانک خون ـ دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۳- متخصص زنان و زایمان ـ استاد مرکز تحقیقات مادر، جنین و نوزاد ـ بیمارستان ولیعصر ـ دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ تهران ـ ایران
۴- کارشناس علوم آزمایشگاهی ـ مرکز تحقیقات علوم و فن‌آوری تشخیص آزمایشگاهی ـ دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز ـ شیراز ـ ایران
۵- مؤلف مسئول: فوق تخصص خون و انکولوژی کودکان ـ دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون و درمانگاه تالاسمی ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سیستم گروه خونی Rh ، پیچیده‌ترین و پلی‌مورفیک‌ترین سیستم گروه خونی در انسان می‌باشد(۱). این سیستم دارای بیش از ۵۰ نوع آنتی‌ژن است و در انتقال خون بعد از ABO ، مهم‌ترین سیستم از نظر بالینی می‌باشد و نقش مهمی را در ایجاد بیماری همولیتیک جنین و نوزاد (HDFN) ایفا می‌کند(۲). ۵۰٪ از موارد وقوع HDFN مربوط به آنتی‌D (IgG) مادری می‌باشد که از جفت عبور می‌کند و با اتصال به گلبول‌های قرمز جنین، باعث تخریب آن‌ها و در نتیجه بروز آنمی در نوزاد یا جنین و یا عوارض شدیدتر مانند هیدروپس فتالیس و حتی مرگ جنین می‌شود(۳، ۲).

از اواخر دهه ۱۹۶۰ میلادی به بعد، با تزریق ایمونوگلوبولین D به مادر بعد از تولد نوزاد، میزان ایمونیزاسیون RhD مادر از ۱۴٪ به ۱/۵٪ کاهش یافت. در تعدادی از کشورها تزریق قبل از تولد ایمونوگلوبولین D نیز پیشنهاد گردید که همین امر موجب کاهش بیشتر میزان ایمونیزاسیون مادر شد و این مقدار به ۰/۲ تا ۰/۴ درصد رسید(۵، ۴).

از آن جایی که در بسیاری از کشورها از جمله ایران، فنوتیپ RhD جنین تا زمان تولد مشخص نمی‌شود، همه مادران RhD منفی که همسران RhD مثبت دارند، ایمونوگلوبولین D را به صورت پیشگیرانه قبل از تولد نوزادشان در سه ماهه سوم بارداری دریافت می‌کنند. در صورتی که درصد قابل توجهی از این مادران باردار، ایمونوگلوبولین D را به صورت غیر ضروری دریافت می‌کنند(۶).

ایمونوگلوبولین D منشأ انسانی دارد و لذا خطر انتقال عوامل عفونی به خصوص ویروس‌های بیماری‌زا از طریق آن وجود دارد. لذا در صورت امکان باید تلاش گردد که مواجهه غیر ضروری صورت نگیرد(۱۰-۷).

با تعیین قبل از تولد ژنوتیپ RHD جنین می‌توان تزریق ایمونوگلوبولین D را به صورت هدفمند و تنها در مادران باردار RhD منفی که جنین RhD مثبت حمل می‌کنند انجام داد و از تماس بی‌مورد آن‌ها با ایمونوگلوبولین D اجتناب نمود(۱۴-۱۱). مزیت دیگر تعیین ژنوتیپ RHD جنین، مربوط به مادران بارداری می‌باشد که به دلایل مختلف نسبت به آنتی‌ژن D ایمونیزه شده‌اند و در سرمشان آنتی‌D وجود دارد. در مورد این افراد اگر مشخص شود که جنین فنوتیپ RhD منفی دارد، خطری برای بروز HDFN در آن‌ها وجود ندارد و لذا از اقدامات تهاجمی نظیر آمنیوسنتز سریالی، کوردوسنتز و هم چنین زایمان زودرس در مورد آن‌ها جلوگیری می‌شود و اگر RhD جنین به صورت مثبت گزارش شود، اقدامات لازم درمانی مناسب و به موقع به عمل خواهد آمد(۱۵، ۱).

با کشف DNA آزاد جنینی (Cell free fetal DNA = CffDNA) در پلاسمای مادران باردار توسط دنیس‌لو در سال ۱۹۹۷، امکان تعیین ژنوتیپ RHD جنین به روش غیر تهاجمی میسر گشت(۱۶). به طور کلی غلظت CffDNA در جریان خون مادر بسیار کم می‌باشد و با افزایش سن بارداری، مقدار آن نیز افزایش می‌یابد و طی ۱ الی ۲ روز بعد از زایمان به طور کامل از جریان خون مادر پاک می‌شود(۱۹-۱۷).

تعیین ژنوتیپ RHD جنین را با روش‌های معمولی PCR نیز می‌توان انجام داد، اما روش Real Time PCR از دقت، اختصاصیت و حساسیت بیشتری برخوردار می‌باشد (۲۱، ۲۰).

هدف از این مطالعه، بررسی میزان تطابق بین نتایج حاصل از ژنوتیپ RHD جنین با استفاده از روش Real Time PCR و نتایج فنوتیپی RhD نوزاد با روش سرولوژی و هم چنین تعیین جنسیت جنین در هفته‌های نخست بارداری بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی، تعداد ۲۱ مادر باردار RhD منفی که همسر RhD مثبت داشتند مورد ارزیابی قرار گرفتند. حجم نمونه با توجه به مطالعه‌های مشابه پیشین و با استفاده از فرمول شارل کوکران محاسبه گردید. نمونه‌ها از مادرانی که جهت مشاوره‌های زنان و زایمان در محدوده زمانی آبان ماه تا اسفند ماه سال ۱۳۹۳ به بیمارستان‌های امام خمینی(ره) و میرزا کوچک خان تهران مراجعه نمودند، جمع‌آوری گردید. ضمناً تمام نمونه‌ها با جلب رضایت از

www.SID.ir

Archive of SID

افـراد و تکمیـل فـرم رضایت‌نامـه توسط ایشان جمع‌آوری شد.

جمع‌آوری نمونه‌ها و آماده‌سازی آن‌ها:

هر نمونه که حاوی ۵ میلی‌لیتر از خـون کامـل مـادر در لوله حاوی ضد انعقاد EDTA بود، بلافاصله پـس از انتقـال به مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایـران، بـه مـدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ شـد و پلاسـمای رویـی آن جدا و به میکروتیوب استریل منتقل گردید. سـپس ایـن قسمت از پلاسما مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه، ولی این بار بـا دور ۱۳۰۰۰ rpm سـانتریفوژ گردیـد تـا بـه طـور کامـل از سلول‌ها جدا شود. در نهایت قسمت رویی پلاسما برداشـته و به میکروتیوب استریل دیگر منتقل و برای انجـام مراحـل بعـدی کـار، در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

استخراج DNA:

CffDNA بـا اسـتفاده از کیـت Cinna Pure DNA (محصول شرکت سینا کلون، ایـران) اسـتخراج شـد. طبـق دستورالعمل کیت، ۱۰۰ µL از پلاسمای ذوب شـده بـا ۴۰۰ µL از محلول لیز کننده و ۳۰۰ µL محلـول پرسیپیتاسـیون مخلوط و سپس تمام این حجـم بـه میکروتیـوب فیلتـردار منتقل و سانتریفوژ شد. طی ۳ مرحله شستشـو بـا بافرهـای شستشوی شماره ۱ و ۲، نهایتاً DNA در ۳۰ µL از محلـول الوشن حل و برای انجام مراحل بعدی کار، در ۸۰- درجـه سانتی‌گراد ذخیره گردید. لازم به ذکر است که برای کاهش خطر آلودگی، تمامی مراحل جداسازی DNA در زیـر هـود لامینار کلاس ۲ و با اسـتفاده از نـوک سـمپلرهای اسـتریل فیلتردار انجام گرفت.

واکنش Real Time PCR:

جنسیت جنـین و ژنوتیـپ RHD جنـین، بـا اسـتفاده از روش Real Time PCR و به وسیله دستگاه Rotor Gene - ۳۰۰۰ (محصول کشور آلمان) بررسی گردیـد. آغازگرهـای انتخاب شـده و اختصاصـی بـرای ژن‌هـای *RHD* ، *SRY* و بتاگلوبین به وسیله شـرکت ژن فنـاوران(دانمـارک) تهیـه و مورد استفاده قرار گرفت. برای افزایش اختصاصیت مطالعه، سه منطقه ژنی از لکوس RHD (شامل اگزون‌هـای ۵ ، ۷ و ۱۰) ارزیابی و برای تایید حضور DNA نیز از ژن بتاگلوبین و *SRY* استفاده شد(جدول ۱).

هـر واکـنش حـاوی ۱۰ µL از مسـتر مـیکس ۲X سایبرگرین Amplicon (محصـول کشـور دانمـارک)، ۵ µL نمونه DNA ، ۰/۵ µL آغازگر جلوبرنده ، ۰/۵ µL آغـازگر معکوس و ۴ µL از آب مقطر بود که در حجـم نهـایی ۲۰ µL مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول ۱: توالی آغازگرهای جلوبرنده و معکوس از ژن‌های *RHD* و *SRY* و بتاگلوبین

ژن	آغازگر	توالی	اندازه
ACTB	جلوبرنده	GTGCACCTGACTCCTGAGGAGA	۱۰۲ bp
	معکوس	CCTTGATACCAACCTGCCCAG	
SRY	جلوبرنده	TGGCGATTAAGTCAAATTCGC	۱۳۷ bp
	معکوس	CCCCCTAGTACCCTGACAATGTATT	
Exon5	جلوبرنده	CGCCCTCTTCTTGTGGATG	۸۲ bp
	معکوس	GAACACGGCATTCTTCCTTTC	
Exon7	جلوبرنده	CTCCATCATGGGCTACAA	۹۰ bp
	معکوس	CCGGCTCCGACGGTATC	
Exon10	جلوبرنده	CCTCTCACTGTTGCCTGCATT	۷۴ bp
	معکوس	AGTGCCTGCGCGAACATT	

www.SID.ir

Archive of SID

شرایط انجام واکنش نیز به ترتیب مقابل بود: ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به عنوان دناتوراسیون اولیه و برای هر چرخه نیز ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد جهت دناتوراسیون، ۳۰ ثانیه در ۶۱ درجه سانتی‌گراد جهت اتصال آغازگرها(این دما برای همه آغازگرها یکسان بود) و ۳۰ ثانیه نیز در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت تکثیر که در مجموع در ۵۰ چرخه انجام شد. به منظور افزایش حساسیت آزمایش، نمونه‌ها به صورت دوتایی (Duplicate) مورد ارزیابی قرار گرفتند و به همراه آن‌ها از کنترل منفی(فرد مؤنث و RhD منفی)، کنترل مثبت (فرد مذکر و RhD مثبت) و کنترل بدون DNA الگو (NTC) استفاده شد.

نمودار تکثیر هر یک از ژن‌های *RHD* ، *SRY* و بتاگلوبین برای نمونه‌های مورد نظر مورد بررسی قرار گرفت و تفسیر نتایج به این ترتیب انجام شد که اگر هر دو واکنش از هر یک از ژن‌های مذکور، مثبت می‌گردید نتیجه برای آن ژن مثبت در نظر گرفته می‌شد. اگر هر دو واکنش منفی یا تنها یکی از دو واکنش مثبت می‌شد، آزمایش مجدداً به صورت دوتایی تکرار و در مجموع ۴ واکنش نیز، اگر ۲ واکنش یا بیشتر مثبت می‌شد نتیجه برای ژن مورد نظر مثبت و در غیر این صورت منفی تلقی می‌گردید.

یکی از آیتم‌هایی که در تفسیر نتایج می‌تواند راهگشا باشد، بحث چرخه آستانه Ct (Threshold Cycle) می‌باشد. اگر تفاوت Ct بین اگزون‌های RHD و ژن بتاگلوبین کمتر از ۲ باشد، احتمالاً بیانگر آن است که مادر دارای یک ژن غیر قابل بیان یا واریانتی از ژن RHD است که منجر به منفی شدن فنوتیپ RhD وی شده که در این صورت جواب به صورت غیر قابل گزارش محسوب می‌گردد و نیاز به مطالعه ژن RHD بر روی ژنوم مادر می‌باشد(۱۱). Ct اگزون‌های RHD در مواردی که جنین به صورت RHD مثبت می‌باشد، حداقل ۴ تا ۶ عدد بیشتر از Ct ژن کنترل (بتاگلوبین) است(۲۲).

اگر جنین به صورت RHD منفی تعیین ژنوتیپ می‌شد، نتیجه SRY جهت تایید حضور DNA جنینی در مواردی که جنین پسر بود مورد استفاده قرار می‌گرفت. اگر در بین ۳ اگزون، واکنش تنها در اگزون ۱۰ مثبت و در دو اگزون ۵ و ۷ منفی می‌شد، این احتمال وجود داشت که جنین دارای یکی از واریانت‌های RHD مثبت باشد و لذا در نهایت مثبت در نظر گرفته می‌شد.

تایید ژنوتیپ RHD و جنسیت جنین:

خون محیطی و یا خون بند ناف در هنگام تولد از نوزاد جمع‌آوری و آزمون سرولوژی جهت تعیین فنوتیپ RhD انجام گرفت. جنسیت نوزاد نیز در هنگام تولد مشخص گردید.

تجزیه و تحلیل آماری:

داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS ۲۲ و با استفاده از آزمون‌های آماری Chi-square و Cohen's Kappa که تطابق بین نتایج به دست آمده و مورد انتظار را نشان می‌دهد، مورد ارزیابی قرار گرفت و مقدار p کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد. آزمون‌های تعیین حساسیت، ویژگی و دقت آزمایش نیز مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها

در مطالعه حاضر نمونه‌های پلاسمای به دست آمده از ۲۱ زن باردار در محدوده سنی ۲۸-۱۹ سال (میانگین: ۳/۴ ± ۲۴/۶) که در سنین بارداری ۸ الی ۳۸ هفته (میانگین: ۷/۸ ± ۳۲/۷ هفته) قرار داشتند، بررسی گردید و نتایج ژنوتیپی حاصل از آزمایش Real Time PCR با نتایج سرولوژیکی بعد از تولد مقایسه شد.

همه زنان گزارش دادند که در ۳ ماه گذشته خون دریافت نکرده‌اند و هرگز عمل پیوند نداشته‌اند. لازم به ذکر است، هر دو این احتمالات می‌تواند منجر به تغییر در نتایج ژنوتیپ به دلیل امکان سنجش DNA فرد اهداکننده شود.

فنوتیپ RhD مادران در ۲۰ مورد(۹۵/۲٪) از نمونه‌ها به صورت ccddee و در ۱ مورد(۴/۸٪) نیز به صورت CCddee تعیین شد. نتایج ژنوتیپ RHD جنین با آنالیز پلاسمای مادر نشان داد که ۱۷ مورد(۸۵/۷۱٪) از نمونه‌ها RHD مثبت و ۴ نمونه(۱۴/۲۹٪) RHD منفی بودند. کلیه نتایج به دست آمده با نتایج سرولوژی حاصل از خون بند ناف تطابق صددرصدی را نشان داد(جدول ۲).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: نتایج حاصل از ژنوتایپینگ RHD و SRY جنینی توسط روش Real-Time PCR

جنسیت	فنوتیپ Rh نوزاد	ژنوتیپ جنین با استفاده از RT-PCR				فنوتیپ مادر	سن بارداری	نمونه
		SRY	*Exon10*	*Exon7*	*Exon10*			
زن	D +	N	P	P	P	ccddee	۸	۱
مرد	D +	P	P	P	P	-	۲۳	۲
زن	D +	N	P	P	P	ccddee	۲۳	۳
زن	D -	N	N	N	N	ccddee	۲۵	۴
زن	D +	N	P	P	P	ccddee	۲۹	۵
مرد	D +	P	P	P	P	ccddee	۳۰	۶
مرد	D -	P	N	N	N	ccddee	۳۲	۷
زن	D +	N	P	P	P	-	۳۳	۸
مرد	D +	P	P	P	P	ccddee	۳۴	۹
مرد	D +	P	P	P	P	ccddee	۳۵	۱۰
مرد	D +	P	P	P	P	CCddee	۳۵	۱۱
مرد	D +	P	P	P	P	ccddee	۳۵	۱۲
زن	D +	N	P	P	P	ccddee	۳۷	۱۳
زن	D +	N	P	P	P	ccddee	۳۷	۱۴
مرد	D -	P	N	N	N	ccddee	۳۸	۱۵
مرد	D -	P	N	N	N	ccddee	۳۸	۱۶
مرد	D +	P	P	P	P	ccddee	۳۸	۱۷
مرد	D +	P	P	P	P	ccddee	۳۹	۱۸
زن	D +	N	P	P	P	ccddee	۳۹	۱۹
زن	D +	N	P	P	P	ccddee	۳۹	۲۰
زن	D +	N	P	P	P	ccddee	۳۹	۲۱

جدول ۳: ارزیابی میزان تطابق و تعیین حساسیت، ویژگی و دقت آزمایش ژنوتایپینگ

	RHD	SRY
تطابق	٪۱۰۰ (۲۱/۲۱)	٪۱۰۰ (۲۱/۲۱)
حساسیت	٪۱۰۰	٪۱۰۰
منفی کاذب		
اختصاصیت	٪۱۰۰	٪۱۰۰
مثبت کاذب		
دقت	٪۱۰۰	٪۱۰۰
p value	< ۰/۰۰۰۵	< ۰/۰۰۰۵
Cohen's Kappa	۱	۱

لذا، اختصاصیت، حساسیت و دقت آزمون تعیین ژنوتیپ RHD جنین با استفاده از روش Real Time PCR در این مطالعه ۱۰۰٪ تعیین گردید(۱۰۰٪ =K ؛ ۰/۰۰۰۵ >p) (جدول ۳).

آنالیز نتایج Real Time PCR در مورد ژن SRY نیز در هر ۲۱ نمونه با جنسیت نوزاد بعد از تولد مطابقت داشت. ۱۱ مورد (۵۲/۳٪) از نمونه‌ها به صورت مذکر و ۱۰ مورد (۴۷/۷٪) نیز به صورت مؤنث تعیین جنسیت شدند که در مورد این ژن نیز اختصاصیت، حساسیت و دقت آزمایش، ۱۰۰٪ محاسبه شد(۱۰۰٪ =K ؛ ۰/۰۰۰۵ >p). ژن ACTB در تمام نمونه تشخیص داده شد(جداول ۲ و ۳).

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

در مطالعه حاضر، با بررسی ژنوتیپ RHD جنین در ۲۱ نمونه DNA که از پلاسمای مادران RHD منفی استخراج شده بود، مشخص شد که ۸۵/۷۱٪ از نمونه‌ها، RHD مثبت و ۱۴/۲۹٪ منفی هستند که این نتایج با یافته‌های آزمایش سرولوژی بعد از تولد مطابقت کامل داشتند. هم چنین در آزمایش ژنوتایپینگ تعیین جنسیت با ژن *SRY* ۱۱ مورد (۵۲/۳٪) از نمونه‌ها مذکر و ۱۰ مورد (۴۷/۷٪) مؤنث تشخیص داده شدند که صحت کلیه نتایج به دست آمده بعد از تولد نوزادان به اثبات رسید.

در تعیین ژنوتیپ RHD جنین چالش‌های فراوانی وجود دارد که توجه به آن‌ها جهت دستیابی به نتایج دقیق دارای اهمیت فراوانی می‌باشد. از آن جایی که سیستم Rh بسیار پیچیده است، احتمال نتایج مثبت و منفی کاذب در تعیین ژنوتیپ RHD جنین همواره وجود دارد که باید به این مسأله توجه داشت. به طور کلی تعیین پلی‌مورفیسم‌های یک ژن و فراوانی آن‌ها در یک جمعیت خاص، مرحله‌ای مهم در تعیین ژنوتیپ RHD جنین محسوب می‌شود که تاکنون مطالعه‌ای در این زمینه در کشور ایران صورت نگرفته است لذا تا حد امکان باید سعی کرد که اگزون‌ها و آغازگرها به گونه‌ای انتخاب و طراحی شوند که با استفاده از آن‌ها بتوان نتایج مثبت و منفی حقیقی را از واریانت‌های RHD افتراق داد. جهت دستیابی به این مهم، می‌توان از مقالات معتبری که در این زمینه فعالیت کرده‌اند، استفاده و کسب تجربه نمود(۲۳). به عنوان نمونه محققان برای اجتناب از نتایج منفی کاذب، معمولاً بررسی حداقل دو اگزون از ژن *RHD* را پیشنهاد می‌کنند(۲۵، ۲۴).

آیکوت و همکارانش در سال ۲۰۱۳، با استفاده از آغازگرهای دو اگزون ۷ و ۱۰، ژنوتیپ RHD جنین را مورد ارزیابی قرار دادند که نتایج با یافته‌های سرولوژیکی بعد از تولد، مطابقت کامل داشت(۲۶).

در مطالعه حاضر نیز سه اگزون ۵، ۷ و ۱۰ مورد ارزیابی قرار گرفت. علت استفاده از اگزون ۱۰ در کنار اگزون ۵ و ۷ این بود که در اکثر واریانت‌های هیبرید ژن *RHD* ، اگزون ۱۰ دست نخورده باقی می‌ماند و لذا اگر در Real Time PCR نتایج مربوط به اگزون‌های ۵ و ۷ منفی و اگزون ۱۰ مثبت شود، احتمال حضور یک واریانت از ژن *RHD* را مطرح می‌کند. به این ترتیب با انتخاب صحیح اگزون‌ها از نتایج منفی کاذب در تعیین ژنوتیپ RHD جنین جلوگیری شد(۲۳).

به علت وجود تشابه تقریبا ۹۶ درصدی بین قطعات ژنی *RHD* و *RHCE* ، آغازگرها باید به گونه‌ای انتخاب شوند که قابلیت تمایز بین این دو ژن را به خوبی داشته باشند. در مطالعه حاضر نیز آغازگرها با توجه به توالی نوکلئوتیدی این دو ژن و اطلاعات موجود در مقالات به گونه‌ای انتخاب گردید که تنها، اختصاصی برای ژن *RHD* بوده و توانایی اتصال و تکثیر اگزون‌های ژن *RHCE* را نخواهند داشت(۲۷، ۱).

مسأله دیگری که در تعیین ژنوتیپ RHD جنین، باید به آن توجه داشت، مسأله غلظت CffDNA در پلاسمای مادر می‌باشد. یکی از علل عمده نتایج منفی کاذب در تعیین ژنوتیپ RHD جنین، غلظت کم CffDNA در پلاسمای مادر است. با افزایش سن بارداری، غلظت CffDNA نیز افزایش می‌یابد (به ویژه در ۳ ماهه آخر بارداری) بنابراین در مواقعی که ژنوتیپ RHD جنین در هفته‌های ابتدایی بارداری، به صورت منفی تعیین شد، ممکن است علت آن کم بودن غلظت CffDNA باشد، لذا برای تایید آن می‌توان آزمایش را چند هفته بعد، با نمونه‌گیری مجدد، تکرار نمود(۲۹، ۲۸).

استفاده از یک ژن خاص به عنوان کنترل داخلی، برای تایید حضور DNA تام (مجموع DNA مادری و جنینی) در پلاسمای مادر ضروری می‌باشد. البته گفتنی است که استفاده از این ژن‌ها، تنها بیانگر حضور DNA در پلاسما است و نمی‌تواند DNA جنینی را از DNA مادری افتراق دهد. ژن بتا گلوبین به همین منظور در مطالعه حاضر استفاده شده است(۳۰).

جهت تمایز DNA جنینی از DNA مادری و به عبارتی تایید حضور CffDNA در پلاسمای مادر نیز، نیاز به مارکری است که اولاً اختصاصی جنین باشد و ثانیاً در پلاسمای مادر حضور داشته باشد. یکی از مارکرهایی که امروزه در این زمینه استفاده می‌شود، ژن *SRY* است که بر روی کروموزوم Y قرار دارد. حضور ژن *SRY* در پلاسمای

www.SID.ir

Archive of SID

مادر، از طرفی بیانگر حضور جنین مذکر در رحم مادر است و از طرف دیگر، مؤید حضور CffDNA در پلاسمای مادر می‌باشد(۲۹، ۱).

وانگ و همکارانش در سال ۲۰۰۹ که بر روی تعیین ژنوتیپ RHD جنین با روش Real Time PCR کار می‌کردند، از ژن بتاگلوبین به عنوان کنترل داخلی و از ژن *SRY* برای تایید حضور DNA جنینی استفاده کردند. ۵۲/۵۶٪ از نمونه‌ها، نتایج مثبت از نظر *SRY* را نشان داد که با جنسیت نوزادان بعد از تولد، مطابقت کامل داشت و به عبارتی آن‌ها توانستند در ۴۱ نمونه(از مجموع ۷۲ نمونه) حضور DNA جنینی را به اثبات برسانند(۳۰). در مطالعه حاضر نیز با استفاده از ژن *SRY* و مثبت شدن ۵۲/۳٪ از نمونه‌ها (۱۱ نمونه) در واکنش Real Time PCR که با جنسیت نوزادان بعد از تولد مطابقت کامل داشت، حضور DNA جنینی در ۱۱ نمونه پلاسما به اثبات رسیده است.

اما زمانی که مادر حامل جنین مونث با ژنوتیپ RHD منفی می‌باشد، استفاده از مارکر SRY برای تایید حضور CffDNA دیگر کمکی نخواهد کرد(۱). برای حل این مشکل امروزه از مارکرهای دیگری استفاده می‌شود که پر کاربردترین آن‌ها ژنی است به نام RASSF1A (RAS association family 1 A) که یک ژن سرکوبگر تومور می‌باشد. پروموتر این ژن در DNA جنینی به صورت هایپر متیله و در DNA مادری به صورت هایپو متیله می‌باشد و مارکر مناسبی در تعیین DNA جنینی است(۳۲، ۳۱). به این منظور از آنزیمی به نام Bst U1 استفاده می‌گردد که موجب هضم سکانس‌های DNA مادری (که در آن ژن *RASSF1A* به صورت هایپو متیله است) می‌شود، در صورتی که در DNA جنینی(که ژن *RASSF1A* به صورت هایپر متیله می‌باشد) تغییری ایجاد نمی‌کند. سپس می‌توان سکانس‌های هضم نشده DNA جنینی را برای تعیین ژنوتیپ RHD ، مورد بررسی قرار داد(۲۴).

لازم به ذکر است که محدودیت مطالعه حاضر، عدم وجود کنترل داخلی مناسب با قابلیت آنالیز بیشتر(مارکری هم چون RASSF1A) جهت تایید حضور DNA جنینی در مواقعی که همه نتایج Real Time PCR به جز بتاگلوبین منفی گردد، می‌باشد و امید است که در مطالعه‌های بعدی به این موضوع نیز پرداخته شود.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر، دقت آزمایش تعیین ژنوتیپ RHD جنین را در پلاسمای مادر (بدون نتیجه منفی کاذب) تایید می‌کند. تعیین ژنوتیپ RHD جنین به چند علت می‌تواند در مراکز کلینیکی و آزمایشگاهی مفید و کاربردی باشد. اول این که از تزریق غیر ضروری ایمونوگلوبولین D به خانم‌های باردار با جنین RhD منفی که در این مطالعه شامل ۱۴/۹٪ از نمونه‌ها بود، جلوگیری خواهد شد. مورد بعدی این که از انجام روش‌های تهاجمی در مادران باردار حساس شده با آنتی D که جنین RhD منفی دارند اجتناب می‌گردد و هم چنین زمان کافی جهت انجام اقدامات لازم و به موقع در درمان مادرانی که جنین RhD مثبت حمل می‌کنند، وجود خواهد داشت و دلیل دیگر این که تعیین ژنوتیپ RHD جنین می‌تواند در مواردی که نتایج فنوتیپی RhD نوزاد به صورت منفی کاذب گزارش می‌شود، کمک کند و با تزریق به موقع روگام، از حساس شدن مادر و بروز HDFN در حاملگی های بعدی جلوگیری نماید.

انجام چنین مطالعه‌ای با تعداد نمونه بیشتر می‌تواند انجام روتین این آزمایش را در آزمایشگاه‌های بالینی ایران، امکان‌پذیر سازد. اما قبل از آن باید مشخص نمود که آیا تعیین ژنوتیپ RHD و SRY جنین در کشور ایران از نظر اقتصادی مقرون به صرفه است یا خیر و در آن زمان است که استفاده از این آزمایش به دلایلی که پیشتر به آن‌ها اشاره شد می‌تواند مفید و کاربردی باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته هماتولوژی و بانک خون مصوب مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

References :

1- Oliveira J, Osório N, Rocha J, Cruz B, Figueiredo J, Caseiro A, *et al*. Fetal RHD and RHCE genotyping in plasma of Rh negative pregnant women. International Journal of Biomedical Laboratory Science 2012; 1(2): 50-8.
2- Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. Blood 2000; 95(2): 375-87.
3- Hromadnikova I, Vechetova L, Vesela K, Benesova B, Doucha J, Kulovany E, *et al*. Non-invasive fetal RHD exon 7 and exon 10 genotyping using real-time PCR testing of fetal DNA in maternal plasma. Fetal Diagn Ther 2005; 20(4): 275-80.
4- Wikman AT, Tiblad E, Karlsson A, Olsson ML, Westgren M, Reilly M. Noninvasive single-exon fetal RHD determination in a routine screening program in early pregnancy. Obstet Gynecol 2012; 120(2 Pt 1): 227-34.
5- Bowman JM, Chown B, Lewis M, Pollock JM. Rh isoimmunization during pregnancy: antenatal prophylaxis. Can Med Assoc J 1978; 118(6): 623-7.
6- van der Schoot CE, Hahn S, Chitty LS. Non-invasive prenatal diagnosis and determination of fetal Rh status. Semin Fetal Neonatal Med 2008; 13(2): 63-8.
7- Legler TJ, Muller SP, Haverkamp A, Grill S, Hahn S. Prenatal RhD Testing: A Review of Studies Published from 2006 to 2008. Transfus Med Hemother 2009; 36(3): 189-98.
8- Power JP, Davidson F, O'Riordan J, Simmonds P, Yap PL, Lawlor E. Hepatitis C infection from anti-D immunoglobulin. Lancet 1995; 346(8971): 372-3.
9- Liumbruno GM ,D'Alessandro A, Rea F, Piccinini V, Catalano L, Calizzani G, *et al*. The role of antenatal immunoprophylaxis in the prevention of maternal-foetal anti-Rh(D) alloimmunisation. Blood Transfus 2010; 8(1): 8-16.
10- Kumpel BM. Lessons learnt from many years of experience using anti-D in humans for prevention of RhD immunization and haemolytic disease of the fetus and newborn. Clin Exp Immunol 2008; 154(1): 1-5.
11- Amaral DR, Credidio DC, Pellegrino J Jr, Castilho L. Fetal RHD genotyping by analysis of maternal plasma in a mixed population. J Clin Lab Anal 2011; 25(2): 100-4.
12- Clausen FB. Integration of noninvasive prenatal prediction of fetal blood group into clinical prenatal care. Prenat Diagn 2014; 34(5): 409-15.
13- Hill M, Finning K, Martin P, Hogg J, Meaney C, Norbury G, *et al*. Non-invasive prenatal determination of fetal sex: translating research into clinical practice. Clin Genet 2011; 80(1): 68-75.
14- Urbaniak SJ, Greiss MA. RhD haemolytic disease of the fetus and the newborn. Blood Rev 2000; 14(1): 44-61.
15- Daniels G, Finning K, Martin P, Summers J. Fetal blood group genotyping: present and future. Ann N Y Acad Sci 2006; 1075: 88-95.
16- Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, *et al*. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet 1997; 350(9076): 485-7.
17- Birch L, English CA, O'Donoghue K, Barigye O, Fisk NM, Keer JT. Accurate and robust quantification of circulating fetal and total DNA in maternal plasma from 5 to 41 weeks of gestation. Clin Chem 2005; 51(2): 312-20.
18- Galbiati S, Smid M, Gambini D, Ferrari A, Restagno G, Viora E, *et al*. Fetal DNA detection in maternal plasma throughout gestation. Hum Genet 2005; 117(2-3): 243-8.
19- Yu SC, Lee SW, Jiang P, Leung TY, Chan KC, Chiu RW, *et al*. High-resolution profiling of fetal DNA clearance from maternal plasma by massively parallel sequencing. Clin Chem 2013; 59(8): 1228-37.
20- Machado IN, Castilho L, Pellegrino J Jr, Barini R. Fetal rhd genotyping from maternal plasma in a population with a highly diverse ethnic background. Rev Assoc Med Bras 2006; 52(4): 232-5.
21- Finning K, Martin P, Daniels G. A clinical service in the UK to predict fetal Rh (Rhesus) D blood group using free fetal DNA in maternal plasma. Ann N Y Acad Sci 2004; 1022: 119-23.
22- Dziegiel MH, On behalf of the Danish Network for Antenatal RHDS. Noninvasive prenatal screening for RHD: the 1st national antenatal directed anti-D prophylaxis program – the Danish model or a guide to robust prediction of need of anti-D. ISBT Science Series 2012; 7(1): 160-3.
23- Clausen FB, Damkjær MB, Dziegiel MH. Noninvasive fetal RhD genotyping. Transfus Apher Sci 2014; 50(2): 154-62.
24- Daniels G, Finning K, Martin P, Massey E. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal blood group phenotypes: current practice and future prospects. Prenat Diagn 2009; 29(2): 101-7.
25- van der Schoot CE, Tax GH, Rijnders RJ, de Haas M, Christiaens GC. Prenatal typing of Rh and Kell blood group system antigens: the edge of a watershed. Transfus Med Rev 2003; 17(1): 31-44.
26- Aykut A, Onay H, Sagol S, Gunduz C, Ozkinay F, Cogulu O. Determination of fetal rhesus d status by maternal plasma DNA analysis. Balkan J Med Genet 2013; 16(2): 33-8.
27- Hromadnikova I, Vechetova L, Vesela K, Benesova B, Doucha J, Vlk R. Non-invasive fetal RHD and RHCE genotyping using real-time PCR testing of maternal plasma in RhD-negative pregnancies. J Histochem Cytochem 2005; 53(3): 301-5.
28- Schmidt LC, Cabral AC, Faria MA, Monken F, Tarazona-Santos E, Martins ML. Noninvasive fetal RHD genotyping from maternal plasma in an admixed Brazilian population. Genet Mol Res 2014; 13(1): 799-805.
29- Randen I, Hauge R, Kjeldsen-Kragh J, Fagerhol MK. Prenatal genotyping of RHD and SRY using maternal blood. Vox Sang 2003; 85(4): 300-6.
30- Wang XD, Wang BL, Ye SL, Liao YQ, Wang LF, He ZM. Non-invasive foetal RHD genotyping via real-time PCR of foetal DNA from Chinese RhD-negative maternal plasma. Eur J Clin Invest 2009; 39(7): 607-17.
31- Chiu RW, Lo YM. Non-invasive prenatal diagnosis by fetal nucleic acid analysis in maternal plasma: the

www.SID.ir

Archive of SID

coming of age. Semin Fetal Neonatal Med 2011; 16(2): 88-93.

32- Chan KC, Ding C, Gerovassili A, Yeung SW, Chiu RW, Leung TN, *et al*. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. Clin Chem 2006; 52(12): 2211-8.

www.SID.ir

Archive of SID

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2016; 13(1): 19-28

Original Article

Fetal RHD genotyping of RhD negative women by Real-time PCR

Ahmadi M.H.[1], Amirizadeh N.[1], Hantushzadeh S.[2], Okhovat M.A.[3], Sayyadi M.[1], Valikhani A.[1], Azarkeivan A.[1,4]

[1]*Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran*
[2]*Research Center of the Mother, Fetus and New Born, Vali-e-Asr Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[3]*Diagnostic Laboratory Sciences and Technology Research Center, School of Paramedical Sciences, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran*
[4]*Adult Thalassemia Clinic, Tehran, Iran*

Abstract

Background and Objectives

The RhD antigens play a significant role in Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn (HDFN). The intention of this study is to determine the RHD fetal genotype in the maternal plasma of RhD negative pregnant women and sex determination of the fetus in the initial weeks of pregnancy by Real-time PCR technique.

Materials and Methods

In this descriptive study, we used 21 plasma samples from RhD negative pregnant women. DNA was extracted from samples by Cinnapure DNA Kit. Real time PCR reactions were done with specific primers for RHD gene exons 5, 7 and 10, and beta-globin and SRY genes. The sex and Rh phenotype of children were obtained after delivery.

Results

Among the pregnant women, 11 (52.4%) were carrying male and 10 (47.6%) were carrying female fetuses. Out of 11 male fetuses, 10 (91%) were RhD-positive and one (9%) was RhD-negative. Out of 10 female fetuses, 9 (90%) were RhD-positive and one (10%) was RhD-negative. All prenatal genotype testing results were in concordance with postnatal RhD status and fetal sex without any false- positive or -negative results.

Conclusions

Performing Real-time PCR on CffDNA showed accurate, efficient and reliable results, allowing rapid and high throughput noninvasive prenatal diagnosis and determination of fetal sex and RhD status in clinical samples. This method helps RhD negative pregnant women with the proper use of immunoglobulin D and on the management and prevention of Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn (HDFN).

Key words: Prenatal Screening, Rh-Hr Blood-Group System, Sex Determination Analysis, Genotyping Techniques, Real-Time PCR

Received: 22 Jul 2015
Accepted: 22 Nov 2015

Correspondence: Azarkeivan A., MD. Pediatrics Hematologist-Oncologist. Associate Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine and Adult Thalassemia Clinic.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88074135; Fax: (+9821) 22087853
E-mail: *azazarkeivan@yahoo.com*

www.SID.ir