خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۲ شماره ۳ تابستان ۸۵ (۱۰۰-۹۳)

تشخیص غیر تهاجمی ژنوتایپ RhD جنین انسان از نمونه سرم مادران RhD- منفی با استفاده از Hemi-nested PCR

فرزانه رهمدانی[۱]، دکتر سیدعلیرضا مصباح نمین[۲]، دکتر تقی طریحی[۳]

چکیده

سابقه و هدف

آنتی‌ژن RhD در ایجاد بیماری‌های همولیتیک نوزادان نقش مهمی دارد و از آن‌جایی که تعیین RhD جنین با استفاده از روش‌های تهاجمی مانند آمنیوسنتز، خطراتی را برای مادر و جنین به دنبال خواهد داشت، در این پژوهش تلاش گردید تا ژنوتایپ RhD جنین از DNA آزاد جنینی موجود در سرم مادران باردار، به صورت غیر تهاجمی و با استفاده از روش Hemi-nested PCR تعیین گردد.

مواد وروش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی(experimental) بود. نمونه‌های خون ۴۵ مادر باردار RhD- منفی که همسر RhD- مثبت داشتند جمع‌آوری شد و DNA آزاد سرم آن‌ها با روش فنل کلروفرم استخراج گردید. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و در دو دور PCR، قطعه‌ای از اگزون ۱۰ ژن RhD تکثیر شد. برای تایید نتایج منفی حاصله بر روی نمونه‌های مادران باردار حامل جنین RhD- منفی، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی قطعه‌ای از ژن دیگری به نام RhCE تکثیرگردید.

یافته‌ها

پس از تولد، پیگیری انجام شده در ردیابی نتایج سرولوژیکی بند ناف نوزادان و ارزیابی نتایج حاصل از این پژوهش مشخص نمود که در ۳۷ مورد از ۴۱ نمونه قابل پیگیری، RhD جنین به میزان ۹۵/۴۵٪ به درستی تعیین شده است. نتایج مربوط به ۴ نمونه باقیمانده شامل یک مورد منفی کاذب و سه مورد مثبت کاذب بوده است.

نتیجه گیری

این پژوهش نشان داد که برای تشخیص پیش از تولد گروه خونی RhD جنین به روش غیر تهاجمی و با کمترین احتمال خطر برای نوزاد، نمونه‌های سرمی مادران بسیار مناسب است. در این ارتباط استفاده از روش‌های جدید و حساس مولکولی مانند روش Hemi-nested PCR و به دست‌آوردن درصد بالایی از میزان تشخیص ژنوتایپ RhD این امیدواری را به ارمغان می‌آورد که با حذف تمام عوامل مداخله‌گر و تکمیل این روش، می‌توان این تشخیص را با اطمینان بالایی در کلینیک به کار برد.

کلمات کلیدی: بارداری، سرم ،RhD، RhCE، PCR

تاریخ دریافت: ۸۴/۸/۱۵
تاریخ پذیرش: ۸۵/۴/۱۳

۱- کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی ـ دانشگاه تربیت مدرس- صندوق پستی ۳۳۱-۱۴۱۱۵
۲- مؤلف مسؤول: PhD بیوشیمی بالینی ـ استادیار دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۳- PhD آناتومی ـ استاد دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-17]

مقدمه

سیستم گروه خونی Rh که در سال ۱۹۳۹ توسط لوین و استنسون شناخته شد، از پلی مورفیک‌ترین و ایمونوژنیک‌ترین سیستم‌های گروه خونی شناخته شده در انسان است و به علت نقشی که در ایجاد بیماری‌های همولیتیک نوزاد وجنین (HDN=Hemolytic disease of the newborn and fetus) ، واکنش‌های همولیتیک ناشی از انتقال خون و آنمی همولیتیک اتوایمیون دارد، در پزشکی از اهمیت زیادی برخوردار است(۲، ۱).

لوکوس Rh بر روی بازوی کوتاه کروموزوم یک، (۱P۳۴/۱_۱P۳۶) در فضایی کمتر از ۴۵۰۰۰۰ جفت باز قرار دارد و دو ژن RhD و RhCE از نظر ردیف‌های بازی، جهت‌گیری مقابل به هم دارند و هر کدام دارای ۱۰ اگزون می‌باشند(۴، ۳). بررسی اسیدهای آمینه نشان می‌دهد که محصولات ژن‌های فوق بسیار مشابه هستند و هر دو این ژن‌ها پروتئین‌های حاوی ۴۱۷ اسید آمینه را رمزدهی می‌کنند که حدود ۸ درصد با هم اختلاف دارند. یکی از این ژن‌ها آنتی‌ژن D را کنترل می‌کند و ژن دوم کد کننده پلی‌پپتیدهای C/c و E/e است. آنتی‌ژن D فقط روی گلبول‌های قرمز افراد RhD- مثبت و پلی‌پپتیدهای C/c و E/e روی گلبول‌های قرمز همه افراد حضور دارند و این نکته، اساس تشخیص قبل از تولد RhD جنین را از خون مادران باردار RhD- منفی تشکیل می‌دهد(۴).

آنتی‌ژن D قوی‌ترین و ایمونوژنیک‌ترین آنتی‌ژن این سیستم گروه خونی است و در نتیجه، مسؤول اکثر موارد ایمنی‌زایی نسبت به آنتی‌ژن‌های سیستم Rh می‌باشد(۲).

مادران باردار RhD- منفی که همسران RhD- مثبت دارند، چنانچه فرزند قبلی آن‌ها RhD- مثبت باشد و نسبت به آنتی‌ژن RhD حساس شده باشند، جنین آن‌ها در خطر بیماری‌های همولیتیک HDN قرار دارد. البته از سال ۱۹۶۸ با به کارگیری anti-D ایمونوگلوبین(در قالب دارویی تحت عنوان روگام)، موارد بیماری ایجاد شده توسط anti-D و HDN کاهش یافته‌است، اما هنوز ناسازگاری RhD مهم‌ترین عامل ایجاد بیماری می‌باشد، اگر چه نسبت ناسازگاری‌های خونی مربوط به سایر آنتی‌ژن‌های سیستم Rh افزایش یافته است(۵).

لذا تعیین گروه خونی RhD جنین، به خصوص در مراحل ابتدایی بارداری اهمیت دارد و به کنترل وضعیت بارداری‌های در خطر بیماری‌های همولیتیک کمک خواهدکرد.

اما برای تعیین پیش از تولد RhD جنین معمولاً از روش‌های تهاجمی نظیر آمنیوسنتز یا نمونه‌گیری از پرزهای کوریونی استفاده می‌شود که خطراتی برای مادر و جنین به دنبال دارد (۷، ۶). در جستجو برای یافتن روش‌های مناسب‌تر جهت تشخیص قبل از تولد و به دنبال کشف مقادیر زیاد DNA آزاد توموری در پلاسما و سرم بیماران مبتلا به سرطان و پس از آن پی‌بردن به وجود DNA جنینی در جریان خون مادران باردار، بهره‌برداری از ایده فوق آغاز گردید(۱۱-۸).

با شناخت این منبع ارزشمند یا مواد ژنتیکی جنینی موجود در خون مادران که هم در اوایل بارداری قابل دسترس است و هم مقادیر نسبتاً بالا و پیش رونده‌ای در دوران بارداری دارد، تشخیص‌های پیش از تولد با استفاده از روش‌های غیر تهاجمی امکان‌پذیر شد(۱۵-۱۲).

در این تحقیق با استفاده از اطلاعات مربوط به وجود DNA آزاد جنینی در خون مادران باردار و کاربردهای آن و همچنین روش Hemi-nested PCR، ژنوتایپ RhD جنین از سرم خون مادران باردار RhD- منفی که همسران RhD- مثبت داشتند تعیین گردید(۱۶).

مواد و روش ها

ابتدا نمونه‌های خون افراد سالم داوطلب RhD- مثبت و RhD- منفی جمع‌آوری و رقت‌های مختلفی از این خون‌ها تهیه شد. برای این منظور مخلوط‌های زیر از افراد RhD- مثبت (D^+) و RhD- منفی(D^-) به عنوان نمونه‌های کنترل تهیه گردید: کنترل اول شامل ۱۰ میکرولیتر از (D^+) با یک میلی‌لیتر از (D^-)، کنترل دوم شامل ۱۰۰ میکرولیتر از (D^+) با یک میلی‌لیتر از (D^-)، کنترل سوم شامل یک میلی‌لیتر از (D^+) با یک میلی‌لیتر از (D^-)، کنترل چهارم شامل تنها یک میلی‌لیتر از (D^+) به عنوان نمونه کنترل مثبت و بالاخره کنترل پنجم نیز شامل تنها یک میلی‌لیتر از (D^-) به عنوان نمونه کنترل منفی در نظر گرفته شد. از میان

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-17]

روش‌های مختلف به کار رفته برای جداسازی DNA نمونه‌ها، روش استاندارد فنل ـ کلروفرم پاسخ مناسبی داد(۱۷). لازم به ذکر است که انتظار نداریم در سرم یا پلاسمای نمونه‌های افراد سالم، DNA وجود داشته باشد لذا از خون تام این نمونه‌های کنترل، DNA استخراج گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از نوع Hemi-nested PCR برای تکثیر قطعه‌ای از ژن RhD، روی این نمونه‌های کنترل تکرار گردید تا این‌که نمونه کنترل اول تهیه شده تکثیر یافت. به این ترتیب روش کار برای نمونه‌های اصلی پژوهش فراهم شد.

بنابراین نمونه‌گیری از مادران باردار RhD– منفی که همسران RhD– مثبت دارند پس از اعلام رضایت مادران و رعایت تمام اصول اخلاق پزشکی، آغاز شد. نمونه‌گیری از ۴۵ مادر باردار، به مقدار ۲cc خون انجام گرفته نمونه‌ها در لوله‌های بدون ماده ضد انعقاد جمع‌آوری شد. این نمونه‌ها مدت سه روز در دمای ۴۵^{oC} به این منظور که در زمان لخته شدن خون، با پاره شدن سلول‌ها میزان DNA الگو افزایش یابد نگهداری شدند(۱۹، ۱۸). پس از آن خون‌ها در دور rcf ۹۰۰(یا rpm ۲۵۰۰) به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و سرم آن‌ها جدا شد و ۲۰۰ میکرولیتر از سرم برای استخراج DNA به روش استاندارد فنل کلروفرم استفاده گردید(۱۷).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: با استفاده از روش Hemi-nested PCR قطعه‌ای از اگزون ۱۰ ژن RhD در کروموزوم ۱ انسان (با شماره NM–۰۱۶۱۲۴ در بانک ژن) تکثیر شد. برای این منظور از آغازگرهای به کار رفته توسط گروه دنیس لو استفاده شد که به شرح زیر می‌باشد؛ آغازگر جلوی اول با نام (RD-A3) و با ردیف بازی 5'-TAA GCA AAA GCA TCC AAG AA GGA TTT-3'، آغازگر عقب با نام (RD-2) و با ردیف بازی 5'-ACT GGA TGA CCA CCA TCA TAT-3' و بالاخره آغازگر جلوی دوم با نام (RD-5) و با ردیف بازی 5'-CAA GGC CTG TTC AAA AAC AAG-3' (۲۰). در واکنش خارجی PCR و با استفاده از آغازگرهای RD-A3 و RD-2 قطعه‌ای به طول ۲۹۱ جفت باز تکثیر گردید.

سپس با استفاده از آغازگرهای داخلی RD-5 و RD-2 قطعه‌ای به طول ۲۶۲ جفت باز درون قطعه اول تکثیر شد.

شرایط انجام PCR به صورت زیر بوده است:

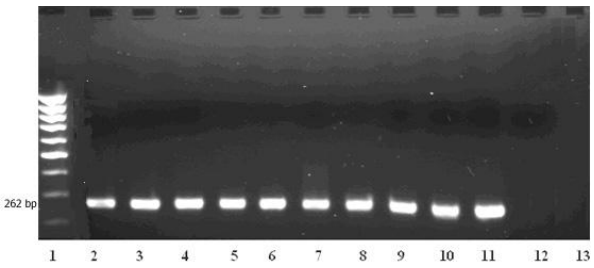
دناتوره شدن اولیه DNA در دمای ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه و برنامه حرارتی سیکل‌ها در این روش به ترتیب در دمای ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، در دمای ۵۷ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و در دمای ۷۲ درجه به مدت ۴۰ ثانیه انجام شد. تعداد سیکل‌ها در دور اول ۲۵ و در دور دوم ۳۰ سیکل بود. در دور دوم PCR، از نمونه‌های DNA تکثیر یافته دور اول با رقت $\frac{۱}{۵۰}$ به عنوان الگو استفاده گردید و برنامه حرارتی آن به همان صورت دور اول به اجرا در آمد. محصولات دور دوم PCR، روی ژل آگارز ۱/۶ درصد حاوی اتیدیوم بروماید $۱۰\ ^{mg}/_{ml}$ الکتروفورز شد. نتیجه الکتروفورز نیز با دستگاه حاوی لامپ ماورای بنفش (UV Doc) مورد بررسی قرار گرفت. بعد از انجام PCR روی نمونه‌های DNA استخراج شده از سرم مادران باردار و تعیین حضور یا عدم حضور ژن RhD، برای تایید نمونه‌های RhD– منفی، واکنش PCR برای تکثیر قطعه‌ای از ژن RhCE(NM-020485) روی نمونه‌های DNA استخراج شده از سرم مادران باردار حامل جنین RhD– منفی، انجام شد. برای این منظور از آغازگرهای جلوی RD-A3 مشترک با ژن RhD، و عقب مخصوص آن (5'-ACC CTA CAA CTG AGC rRhCE ACA ACC-3') استفاده شد و قطعه‌ای به طول ۵۱۵ جفت باز با شرایط به کار رفته و مشابه برای ژن RhD تکثیر شد.

یافته ها

در این پژوهش، به منظور تشخیص پیش از تولد جنین واجد RhD، شیوه غیر تهاجمی از طریق تجزیه خون مادر به کار برده شد. ابتدا نمونه‌های خونی افراد واجد RhD و فاقد آن، برای راه‌اندازی روش استفاده گردید. نتایج به دست آمده از به کارگیری روش Hemi-nested PCR برروی این نمونه‌های کنترل، بسیار بی‌نقص و تکرارپذیر بود(شکل ۱).

اما این شیوه بر روی سرم مادران باردار RhD– منفی کمتر تکرار پذیر بود. یکی از دلایل آن این بود که مجری این طرح و تمام افرادی که در آزمایشگاه رفت و آمد

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-17]



شکل۱ : الکتروفورز محصولات دوردوم Hemi-nested PCR حاصل از تکثیر بخشی از اگزون ۱۰ ژن RhD به طول ۲۶۲ جفت باز در نمونه های کنترل و بر روی ژل آگارز ۱/۶ درصد

چاهک شماره ۱ : DNA مارکر،
چاهک شماره ۲ و ۳ : نمونه کنترل ۱،
چاهک شماره ۴ : نمونه کنترل ۲ ،
چاهک شماره ۵ و ۶ : نمونه کنترل ۳ ،
چاهک شماره ۷، ۸، ۹، ۱۰ و ۱۱ : نمونه کنترل ۴ ،
چاهک شماره ۱۲ : نمونه کنترل ۵ ،
چاهک شماره ۱۳ : نمونه کنترل شاهد

داشتند واجد RhD بودند. سرانجام با به کارگیری تدابیر لازم در کاهش مداخله‌گرها و به دست آوردن نتایج قابل تکرار، بر روی تمام ۴۵ نمونه سرم مادران، آزمایش‌های مورد نظر به اجرا در آمد و نتایج قطعی این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی صحت و سقم این نتایج، پیگیری‌های لازم صورت پذیرفت تا پس از زایمان این مادران، نتایج حاصل از آزمایش‌های سرولوژیک تعیین RhD خون بند ناف و یا خون نوزادان در اختیار این پژوهش قرار گیرد. از ۴۵ مادر، اطلاعات مربوط به ۴۱ مورد در دسترس قرار گرفت که از بین آن‌ها، ۱۹ مادر برای اولین بار و ۲۲ مادر برای دومین و یا چندمین بار باردار شده بودند. زمان نمونه‌برداری از مادران باردار بین ۵ تا ۳۶ هفته بارداری (با میانگین ۱۵ هفته و ۵ روز) بود.

مقایسه نتایج به دست آمده از PCR با نتایج حاصل از آزمایش سرولوژیک تعیین RhD روی خون نوزادان و یا خون بند ناف، نشان داد که از ۲۲ جنین RhD مثبت، ۲۱ مورد با صحت ۹۵/۴۵٪ و میزان حساسیت ۰/۹۵ (۱+۲۱/۲۱ درصد) و از ۱۹ جنین RhD- منفی، ۱۶ مورد با ۸۴/۲۱٪ و میزان ویژگی ۰/۸۴ (۳+۱۶/۱۶ درصد) و همچنین با میزان ارزش پیشگویی تست مثبت (Positive predictive Value) ۸۷٪ (۳+ ۲۱/۲۱ درصد) و ارزش پیشگویی تست منفی (Negative predictive Value) ۹۴٪ (۱+ ۱۶/۱۶ درصد) تشخیص داده شد.

بحث

شایع‌ترین علت آنمی همولیتیک در جنین و نوزاد (HDN)، ناسازگاری‌های خونی بین جنین و مادر است که شامل ناسازگاری خونی ABO و Rh می‌باشد. ناسازگاری خونی Rh، از شدیدترین نوع آن محسوب می‌شود که در مادران RhD- منفی حساس شده به آنتی‌ژن RhD که حامل جنین RhD- مثبت هستند رخ می‌دهد. در واقع در دوران بارداری، اگر مقداری از گلبول‌های قرمز جنین وارد خون مادر شود، ممکن است سبب حساسیت مادر در مقابل آن عوامل گردد. از سال ۱۹۶۸، در درمان HDN اقداماتی صورت گرفته است مانند به کارگیری دارویی به نام روگام که در واقع یک ایمونوگلوبین بر علیه anti-D است و می‌تواند موارد بیماری ایجاد شده توسط anti-D را کاهش دهد، اما هنوز ناسازگاری RhD مهم‌ترین عامل ایجاد بیماری است، اگر چه نسبت ناسازگاری‌های خونی مربوط به سایر آنتی‌ژن‌های سیستم Rh افزایش یافته‌است(۲۱). معمولاً در بیماری همولیتیک Rh، نوزاد اول متولد شده از مادر مبتلا نمی‌شود، چون مادر هنوز ایمن نشده‌است. البته در موارد بسیار نادری امکان بروز این حالت حتی در بارداری اول نیز وجود دارد، مثلاً در مادرانی که قبلاً به طور تصادفی انتقال خون ناسازگار داشته و نسبت به آنتی‌ژن RhD ایمن شده‌اند، همین‌طور در مواردی که از آن با عنوان "تئوری مادربزرگ" (Grandmother effect) نام می‌برند و آن زمانی است که جنین دختر RhD- منفی در رحم مادر، در معرض گلبول‌های قرمز RhD- مثبت مادر قرار بگیرد، که این امکان وجود دارد که در آینده نسبت به آنتی‌ژن RhD حساس شده باشد (۲۲). در کشورهای در حال رشد حتی در کشور ما ایران نیز معمول است که در بارداری اول، بدون اطلاع از Rh جنین در این مادران Rh منفی که همسران Rh مثبت دارند، داروی روگام را محض احتیاط تجویز می‌کنند تا مشکلات مطرح شده به وجود نیاید، در صورتی که اگر روش‌های جدید و دقیق شناسایی آنتی‌ژن RhD در چند هفته اول بارداری به کاربرده شود دیگر نیازی به مصرف بی‌مورد این دارو نیست.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-17]

با توجه به این‌که فراوانی افراد RhD- منفی در میان سفید پوستان به ویژه در کشورهای پیشرفته اروپایی ۱۵٪ برآورد شده است، اهمیت تشخیص ژنوتایپ RhD، آن هم از نوع غیر تهاجمی و به کارگیری روش‌های بسیار نوین مولکولی، امروزه از موضوعات روز و قابل توجه برای پژوهشگرانی می‌باشد که در زمینه بیماری‌های همولیتیک نوزادان مطالعه دارند(۲۳). هدف اصلی این مطالعه نیز اجرای یکی از روش‌های یاد شده است که نتایج آن مورد بررسی قرار گرفته‌است.

بشر طی چند دهه اخیر در مورد درک و شناسایی موقعیت ژن RhD و انواع واریته‌های آن موفقیت‌های زیادی کسب نموده‌است و پیشرفت‌های چشمگیری در به کارگیری روش‌های جدید مولکولی، در استخراج و تکثیر DNA آزاد موجود در سرم یا پلاسما و به کارگیری روش کمی RT-PCR (Real-time PCR)، داشته است و حتی تشخیص غیر تهاجمی و صد درصدی ژنوتایپ RhD را در کلینیک کشورهایی مانند فرانسه، هلند و انگلستان رایج کرده‌است (۲۵، ۲۴). اما در مورد نتایج این تحقیق بنا به دلایلی که آورده شد همواره احتمال به دست آوردن نتایج کاذب مثبت و منفی وجود دارد. در پژوهش حاضر نیز با همه تدابیر لازمی که اتخاذ گردید نتایج کاذب وجود داشت که پس از پیگیری فراغت از زایمان مادران و بررسی نتایج حاصل از آنالیز سرولوژیکی بند ناف نوزادان معلوم گشت. اما در تک نمونه‌ای که در میان ۴۱ نمونه، منفی کاذب شناخته شد، نمونه‌گیری از مادر در هفته پنجم بارداری انجام شده بود و با توجه به این‌که در اوایل بارداری مقادیر کمتری از DNA جنین در خون مادر وجود دارد، احتمال عدم تکثیر ژن‌های جنینی در این دوره از بارداری وجود داشت. البته در موارد کسب نتایج منفی کاذب، احتمال از دست دادن و شکست DNA در زمان حمل و نقل، یا در مراحل استخراج و ذخیره‌سازی را هم نباید نادیده گرفت. البته برای رفع این ابهام تلاش گردید با تکثیر قطعه‌ای از ژن RhCE روی نمونه‌های RhD- منفی، احتمال مربوط به تجزیه و از دست رفتن DNA حذف گردد. با این حال میزان حساسیت این روش در تشخیص درست به میزان ۹۵/۴۵٪ برآورد گردید.

در مورد نتایج مثبت کاذب، می‌توان به یکی از اولین دلایل احتمال آلودگی نمونه‌ها با DNA خارجی در هر مرحله از کار (از نمونه‌گیری تا انجام PCR) استناد کرد. این نکته را هم باید در نظر گرفت که در انجام روش PCR دوگانه به دلیل این‌که محصولات دور اول PCR را برای تکثیر در دور دوم به کار می‌بریم، امکان آلودگی افزایش می‌یابد. البته در این پژوهش برای کنترل آلودگی، در هر دور از PCR از نمونه‌های کنترل یا شاهد نیز استفاده گردید ، اتفاق می‌افتد. همین نتایج مثبت کاذب منجر به کاهش ویژگی این روش به میزان ۸۴٪ برآورد گردید.

اما نقص در تعیین ژنوتایپ RhD ممکن است در نتیجه تغییرات ژنتیکی در ژن RhD باشد. از آن‌جا که تعیین RhD بر اساس حضور یا غیاب ژن RhD در فنوتایپ‌های RhD- مثبت یا RhD- منفی می‌باشد و مطالعات مختلف نشان‌دهنده وجود پلی‌مورفیسم و تنوع در سیستم Rh در جمعیت‌های مختلف است، امکان وجود ناهماهنگی بین نتایج ژنتیکی با نتایج فنوتایپی نیز وجود دارد(۵).

به طور خلاصه این پژوهش نشان می‌دهد که ژنوتایپ RhD جنین از سرم مادران RhD- منفی با درصد بالای ۹۵/۴۵ درصد قابل تعیین بوده‌است. این نتایج در مقایسه با کارهای مشابه انجام شده از صحت نسبتاً بالایی برخوردار است، به طور مثال در سال ۱۹۹۹ گروه بایچوف موفق شدند از ۲۰ نمونه سرم مادران باردار، ۱۴ مورد RhD را به درستی تشخیص بدهند (۷۰٪)(۲۶). در سال ۲۰۰۰ گروه ژانگ موفق به شناسایی کامل ۱۸ مورد RhD- مثبت از نمونه پلاسمایی مادران باردار شدند و از ۴ مورد RhD- منفی، یک مورد مثبت کاذب داشتند (با صحت ۹۵/۵٪)(۲۷). همین گروه در سال ۲۰۰۱ از ۳۴ مورد پلاسمای دیگر، یک مورد منفی کاذب را گزارش کردند (۲/۹ درصد خطا)(۲۸). در سال ۲۰۰۲ گروه لگلر از ۲۷ مورد پلاسما، یک مورد منفی کاذب داشتند (۳/۷ درصد خطا) و در همین سال گروه کاستا موفق شدند با استفاده از روش RT-PCR تمام ۱۰۶ نمونه سرم مادران باردار را شناسایی کنند که نشان‌دهنده حساسیت بالای این روش بر روی نمونه‌های سرمی می‌باشد(۳۰، ۲۹). در سال ۲۰۰۳ گروه ترنر گزارش کردند که با استفاده از خون تام مادران

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-17]

بـاردار، از ۱۷ مـورد RhD- مثبـت، ۳ مـورد منفـی کـاذب داشته‌اند (با صحت کمتر از ۸۲ درصد) و بـالاخره در سـال ۲۰۰۵ گروه رومانیکوا با به کار گیری روش مولکولی کمـی RT-PCR موفـق بـه شناسـایی تمـام ۴۵ نمونـه پلاسـمایی مادران شدند(۳۱، ۲۵).

نتیجه‌گیری

اگر چه این پژوهش موفق به تشـخیص صـد درصـدی گروه خونی RhD از نمونه‌های سـرمی بـه دسـت آمـده از مادران باردار نشده است امـا بـه دسـت آوردن نتـایجی بـا صحت ۹۵/۴۵ درصد حتی با ارزش پیشگویی تست مثبـت ۸۷٪، در مقایسه با گزارش‌هـای پژوهشـگران دیگراهمیـت این تلاش را نشان مـی‌دهـد و ایـن نویـد را مـی‌دهـد کـه مـی‌تـوان بـا حـذف تمـام عوامـل مداخلـه‌گـر و انتخـاب نمونه‌های سرمی در هفته‌های بارداری بیشتر از ۵ ماهگی و نهایتاً تکمیل این روش مولکولی و حساس (Hemi-nested PCR) امکان دست‌یابی به تشخیص بهتر با درصد بـالاتری را بدون این‌که از روش‌های گران قیمت دیگری مانند RT-PCR استفاده نمود، فراهم کرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس که این موضوع را در قالب طرح مصوب پژوهشی، حمایت و پشتیبانی مالی نمودند سپاسگزاری می‌شـود. همچنـین از کلیه کارشناسـان آزمایشـگاه درمانگـاه امـام خمینـی "شـهر قدس" که زحمت تهیه نمونه‌هـای ایـن طـرح را بـر عهـده گرفتند و بالاخره مادران عزیزی که در این راه دشوار ایثـار نمودند کمال تشکر را داریم.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-17]

References :

1- Levine P, Stetson RE. An unusual case of intragroup agglutination. JAMA 1939; 113: 126-127.
2- Agre P, Cartron JP. Molecular biology of the Rh antigens. Blood 1991; 78(3): 551-563.
3- Okuda H, Suganuma H, Kamesaki T, Kumada M, Tsudo N, Omi T, *et al*. The analysis of nucleotide substitutions, gaps, and recombination events between RHD and RHCE genes through complete sequencing. Biochem Biophys Res Commun 2000; 274: 670-683.
4- Wagner FF, Willy AF. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. Blood 2000; 95(12): 3663-3668.
5- Choolani M, Bennett PR, Rodeck CH. Rhesus and other fetomaternal incompatibilities. In: Principles and practice of medical genetics. 4th ed. 2002: 1959-19.
6- Wilson RD. Aminiocentesis and corionic Villus sampling. Curr Opin Obstet Gynecol 2000; 12: 81-86.
7- Tabor A, Bang J, Norgaard-Pedersen B. Feto-maternal hemorrhage associated with genetic amniocentesis: results of a randomized trail. Br J Obstet Gynecol 1987; 94: 528-34.
8- Chen XQ, Stroun M, Magenta JL, Nicod LP, Krut AM, Lyautey J, *et a*l. Microsatellite alterations in plasma DNA of small lung cancer patients. Nat Med 1996; 2:1033-1035.
9- Nawroz H, Koch W, Anker P, Sidransky D. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. Nat Med 1996; 2: 1035-1037.
10- Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargetn IL, Redman CW, *et al.* Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet 1997; 350: 485-487.
11- Bianchi DW. Circulating fetal DNA, its origin and diagnostic potential- a review. Placenta 2004; 18:S93-S101.
12- Bischoff FZ, Nguyen DD, Marques-Do D, Moise KJ, Simpson JL, Elias S. Noninvasive determination of fetal RhD status using fetal DNA in maternal serum and PCR. J Soc Gynecol Invest 1999; 6(2): 64-69.
13- Sekizawa A, Saito H. Prenatal screening of single-gene disorders from maternal blood. Am J Pharmaco 2001; 1(2): 111-117.
14- Lee TH, Montalvo L, Chrebtow V, Busch M. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. Transfusion 2001; 41(2): 276.
15- Finning KM, Martin PG, Soothill PW, Avent ND. Prediction of fetal D status from maternal plasma introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. Transfusion 2002; 423: 1079-1085.
16- Wataganara T, Bianchi DW. Fetal cell-free nucleic acids in the maternal circulation: new clinical applications. Ann N Y Acad Sci 2004; 1022: 90-9.
17- Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning, a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory NY. 2001; 6.4-6.12.
18- Lee TH, Montalvo L, Chrebtow V, Busch MP. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. Transfusion 2001; 41(2): 276-82.
19- Farina A, LeShane ES, Romero R, Gomez R, Chaiworapongsa T, Rizzo N, *et al*. High levels of fetal cell-free DNA in maternal serum: a risk factor for spontaneous preterm delivery. Am J Obstet Gynecol 2005; 193(2): 421-5.
20- Lo Y, Noakes L, Bowell PJ, Fleming KA., Wainscoat JS. Detection of fetal RhD sequence from peripheral blood of senitized RhD-negative pregnant women. British J Haematol 1994; 87: 658-660.
21- Belland L, Pollard J. Red blood cell alloimmunization: Principles and management in pregnancy. J Soc Obstet Gynaeol Can 2001; 23: 221-227.
22- Bowman JM. The development and use of polyclonal prophylactic anti-D IgG Biotest Bull 1997; 5:503-510.
23- Wanger FF, Frohmajer A, Flegel WA. RHD positive haplotypes in D negative Europeans. BMC Genetics 2001; 2: 10-25.
24- Bianchi DW, Avent ND, Costa JM, van der Schoot CE. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal Rhesus D. Obstetrics & Gynecology 2005; 106:841-844.
25- Hromadnikova I, Vechetova L, Vesela K, Benesova B, Doucha J. 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): 301-305.
26- Bischaff FZ, Simpson JL, Elias S. Noninvasive determination of Fetal RhD Status using fetal DNA in maternal Serum and PCR. J Soc Gynecol Invest 1999; 6(2): 64-69.
27- Zhong XY, Holzgreve H, Hahn S. Detection of fetal Rhesus D and sex using fetal DNA from maternal plasma by multiplex polymerase chain reaction. Br J Obstet Gynaecol 2000; 107: 766-769.
28- Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. Risk free simultaneous prenatal identificastion of fetal Rhesus D status and sex by multiplex real-time PCR using cell free fetal DNA in maternal plasma. Swiss Med wkly 2001; 131: 70-74.
29- Legler TJ, Lynen R, Maas JH, Pindur G, Kulenkampff D, Suren A, *et al*. Prediction of fetal RhD and RhCcEe phenotype from maternal plasma with real-time polymerase chain reaction. Transfus Apher Sci 2002; 27(3): 217-223.
30- Costa JM, Giovangrandi Y, El Halali N, Gautier E. Fetal RhD genotyping in maternal serum during the first trimester. Brit J Hematol 2002; 119(1): 255.
31- Turner MJ, Martin GM, O' Leary JJ. Detection of fetal Rhesus D gene in whole blood of women booking for routine antenatal care. Europ J obstet Gynecol 2003; 108: 29-32.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-17]

Non-invasive fetal RhD genotyping by hemi-nested PCR of maternal serum in RhD-negative pregnancies

Rahmdani F.[1](MS), Mesbah-Namin S.A.[1](PhD),Tarihi T.[1](PhD)

[1]College of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University

Abstract

Background and Objectives

RhD antigen has an important role in causing hemolytic diseases in newborns; in testing fetal RhD status by an invasive method such as amniocentesis, it would also harm the fetus and mother. This study tried to detect fetal RhD genotype using free fetal DNA in maternal serum by a noninvasive method using hemi-nested PCR.

Materials and Methods

Blood samples were collected from 45 RhD- negative pregnant women whose spouses were Rh-positive; the women's serum free DNAs were isolated by Phenol-Chloroform method. The exon 10 of the RhD genes was amplified in two rounds of PCR using special primers. For confirmation of negative results obtained in the second PCR, the fragment of the RhCE gene was amplified using special primers.

Results

Follow up and evaluation of the PCR results and relevant serological analysis of cord blood after delivery revealed that in 37 out of 41 cases the RhD had been determined appropriately (95.45%). There were one false-negative and three false-positive cases.

Conclusions

This study showed that maternal serum is very suitable for prenatal diagnosis of fetal RhD using noninvasive methods with minimum risk for neonates. In this regard, modern molecular methods with high sensitivity such as hemi-nested PCR and elimination of interfering factors could be applicable in clinical approaches.

Key words: Pregnancy , Serum, RhD, RhCE, PCR
SJIBTO 2006;3(2): 93-100

Received: 6 Nov 2005
Accepted: 4 Jul 2006

Correspondence: Mesbah-Namin S.A., PhD of Clinical Biochemistry. College of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University
P.O.Box: 14155-331, Tehran, Iran. Tel: (09821) 88011001; Fax: (09821)88013030
E-mail: *mesbahnamin@yahoo.com*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-17]