

PRENATALNA GENOTIPIZACIJA RHD-LOKUSA S POMOĆU LANČANE REAKCIJE POLIMERAZOM U FETUSA S RIZIKOM OD HEMOLITIČKE BOLESTI

PRENATAL GENOTYPING OF THE RHD LOCUS BY POLYMERASE CHAIN REACTION IN FETUS AT RISK OF HEMOLYTIC DISEASE

BERIVOJ MIŠKOVIĆ, FEODORA STIPOLJEV, ITA HADŽISEJDIĆ, BLAŽENKA GRAHOVAC*

Deskriptori: Rh-HR sustav krvnih grupa – genetika; Plodova voda – citologija; DNK – izolacija; Lančana reakcija polimerazom; Prenatalna dijagnoza; Rh izoimunizacija – komplikacije; Anemija – dijagnoza; Fetusne bolesti – dijagnoza

Sažetak. Suvremeni način zbrinjavanja Rh-aloimunizacije podrazumijeva ranu dijagnozu RhD-statusa ploda i točnu procjenu stupnja fetalne anemije uz minimalnu uporabu invazivnih dijagnostičkih i terapijskih postupaka. Stupanj fetalne anemije može se precizno odrediti s pomoću doplerske tehnike, a dijagnoza fetalnog RhD-genotipa postavlja se analizom stanica plodne vode ili fetalne DNA iz plazme RhD-negativnih majki metodom lančane reakcije polimerazom (PCR). Premda se prenatalna dijagnoza RhD-genotipa iz stanica plodne vode s pomoću metode PCR u razvijenim zemljama rutinski primjenjuje već desetak godina, u Hrvatskoj donedavno nije postojala takva mogućnost. Zbog nekorištenja opisane tehnike donedavno je u Hrvatskoj postojao neadekvatan pristup pacijenticama koji se očitovao u nepotrebnim i nesvrhovitim kontrolama, laboratorijskim testiranjima, amniocentezama i kordocentezama. U ovom radu detaljno opisujemo prvi slučaj prenatalne dijagnoze fetalnog RhD-genotipa analizom DNA izolirane iz stanica plodne vode s pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR).

Descriptors: Rh_{HR} blood-group system – genetics; Amniotic fluid – cytology; DNA – isolation and purification; Polymerase chain reaction; Prenatal diagnosis; Rh isoimmunization – complications; Anemia – diagnosis; Fetal diseases – diagnosis

Summary. Modern management of Rh alloimmunization includes early diagnosis of fetal RhD genotype, precise assessment of the severity of fetal anemia and the use of minimal number of invasive diagnostic and therapeutic procedures. The severity of fetal anemia can be assessed by Doppler ultrasound, while fetal RhD genotype is determined from the amniotic cells or fetal DNA extracted from the mother's serum by polymerase chain reaction (PCR). Although prenatal RhD genotype diagnostic techniques have been used in developed countries more than 10 years, they have not been available in Croatia until recently. As a consequence of unavailability of these techniques in Croatia there has been inadequate approach to the patient, in whom inappropriate and unnecessary visits, amniocentesis, cordocentesis and laboratory tests were performed. Therefore, we describe the first case of successful prenatal diagnosis of fetal RhD genotype by PCR analysis of DNA extracted from amniotic fluid cells.

Liječ Vjesn 2008;130:4–6

Aloimunizacija na eritrocitne antigene posljedica je imunskog odgovora majke na eritrocitne antigene ploda koje je plod naslijedio od oca. U kliničkoj praksi najčešće susrećemo senzibilizaciju na Rhesus (Rh) antigene skupine D, C/c i E/e. Uz navedene postoji i niz takozvanih neredovitih antigena (engl. *irregular antigens*) koji, izuzev Kellov antigen, mogu izazvati samo blaži oblik aloimunizacije. Klinički najvažniji i najčešći uzročnik aloimunizacije na eritrocitne antigene je RhD-antigen, a težina bolesti izazvane aloimunizacijom kreće se od klinički neuočljivog oblika pri rođenju do fetalnog hidropsa i intrauterine smrti ploda ako se bolest ne liječi.

Suvremeni način zbrinjavanja Rh aloimunizacije podrazumijeva smanjenje invazivnih dijagnostičkih i terapijskih procedura (amniocenteza, kordocenteza i intrauterinih transfuzija) na što manji broj. Zbog toga je nužno što ranije odrediti RhD-status ploda i točno procijeniti težinu fetalne anemije. Danas se s pomoću doplerske tehnike i mjerenjem vršne brzine protoka krvi kroz središnju moždanu arteriju može precizno odrediti težina fetalne anemije ploda.¹ Za dijagnozu fetalnog RhD-genotipa rabi se metoda lančane reakcije polimerazom (PCR). Dijagnoza se može postaviti DNA-analizom stanica plodne vode ili izravno, analizom fetalne DNA koja se dobije izoliranjem i umnožavanjem iz plazme RhD-negativnih majki.^{2,3}

Temelj prenatalne dijagnostike Rh-aloimunizacije je molekularna analiza RhD i RhCcEe-gena. Rh-lokus na prvom kromosomu sadržava dva visokohomologna, premda različita gena: RhD i RhCcEe. Rh-pozitivne osobe imaju jedan ili dva RhD i dva RhCcEe-gena, dok RhD-negativne osobe imaju dva RhCcEe-gena, ali nemaju gen RhD.⁴ Dva Rh-gena imaju gotovo homologni slijed nukleotida (razlika u 5% slijeda), sastoje se od 10 egzona ukupne veličine >75 kb i oba kodiraju peptide od 417 aminokiselina. Razlike u slijedu nukleotida između RhD i RhCcEe-gena koriste se u genotipizaciji da bi se utvrdilo postoji li RhD-gen. Utvrđivanje prisutnosti RhD-gena s pomoću PCR-metode temelji se na pronalaženju strukturnih razlika u intronu 4 – deleciji od 600 parova baza koliko je kraća intronska sekvenca RhD-gena u odnosu na RhCcEe-gen, te razlike u nuk-

* Klinika za ginekologiju i porodništvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Opća bolnica »Sveti Duh«, Zagreb (prim. mr. sc. Berivoj Mišković, dr. med.), Zavod za patologiju, citologiju i citogenetiku Opće bolnice Sveti Duh, Zagreb (dr. sc. Feodora Stipoljev, dr. med.), Zavod za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, Rijeka (mr. sc. Ita Hadžisejdić, dr. med.; prof. dr. sc. Blaženka Grahovac, dr. med.)

Adresa za dopisivanje: Prim. mr. sc. B. Mišković, Klinika za ginekologiju i porodništvo, Opća bolnica Sveti Duh, Sveti Duh 64, 10 000 Zagreb, berivoj.miskovic@gmail.com

Primljeno 27. veljače 2007., prihvaćeno 29. studenoga 2007.

leotidnim sekvencama egzona 3 i egzona 10 koje su specifične za RhD-gen, dok je sekvenca egzona 7 zajednička za oba gena i služi kao pozitivna kontrola uspješnosti PCR-metode.^{2,5,6}

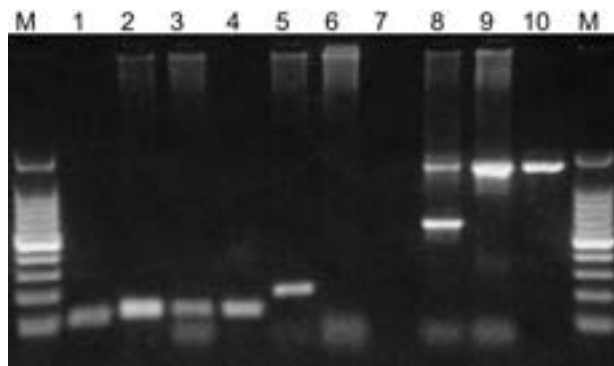
U Hrvatskoj se do sada nije prenatalno određivao RhD-genotip ploda PCR-metodom. Dijagnoza bi izostajala ili bi se, u najboljem slučaju, RhD-ploda odredio s pomoću kordocenteze u drugom tromjesečju trudnoće. U ovom radu želimo izvijestiti o prvom slučaju prenatalne dijagnoze RhD-genotipa ploda iz stanica plodne vode metodom lančane reakcije polimerazom u Hrvatskoj te skrenuti pozornost na njegovo kliničko značenje.

Prikaz bolesnice

Tridesetšestogodišnja trudnica javila se u 10. tjednu četvrte trudnoće u našu kliniku radi drugog mišljenja. Prethodno joj je, temeljem ishoda treće trudnoće, savjetovan prekid trudnoće. Detaljno su objašnjeni mogući klinički ishodi koji direktno ovise o RhD-nalazu ploda. U tom kontekstu ponuđena je mogućnost prenatalne Rh-genotipizacije ploda. Trudnica je odlučila nastaviti trudnoću.

Pacijentica je imala urednu obiteljsku i osobnu anamnezu, krvnu grupu A, fenotip Cde/ce i bila je RhD-negativna. Otac je imao krvnu grupu 0, fenotip Cde/ce i bio je RhD-pozitivan. Prve dvije trudnoće imale su uredan tijek i završile terminskim, vaginalnim porođajima zdrave muške novorođenčadi. Oba novorođenčeta imala su uredne Apgar indekse. Prvo je novorođenče bilo teško 3350 g, a drugo 3850 g. Nije bilo podataka o primjeni primjerene anti-D-profilakse nakon tih porođaja. U trećoj trudnoći dijagnosticirana je Rh-aloimunizacija na temelju pozitivnog indirektnog antiglobulinskog testa, uz nepoznate podatke o dinamici titra protutijela. Trudnoća je završila u 39. tjednu spontanom, vaginalnim porođajem muškog novorođenčeta težine 3050 g i Apgar indeks 7,8. Nakon rođenja, novorođenče je smješteno u jedinicu intenzivnog liječenja zbog izrazite anemije (eritrociti $1,67 \times 10^{12}/L$, hemoglobin 73 g/L, hematokrit 0,20), gdje su učinjene tri eksangvinotransfuzije. Poslijeporođajni tijek bio je kompliciran konvulzijama. Dijete je otpušteno kući 19. dana života. Krvna grupa djeteta bila je 0, RhD-pozitivna.

U 17. tjednu ove trudnoće učinjena je amniocenteza, a iz stanica plodne vode izolirana je i umnožena DNA s pomoću metode PCR. Kakvoća i količina izolirane DNA provjerila se umnožavanjem betaglobinskog gena. U sklopu genotipizacije RhD/RhCcEe, gen RhD selektivno se pokušao umnožiti s pomoću početnica (engl. *primers*) specifičnih za taj gen (tablica 1). Taj se postupak temeljio na razlici u nukleotidnom slijedu između gena RhD i RhCcEe u egzonu 10, razlici u veličini introna 4 i umnožavanju gena RhD u egzonu 7.^{2,5,6} PCR-produkti obojeni etidijevim bromidom prikazani su na 1,5%-tnom agaroznom gelu u usporedbi s mo-



Slika 1. Analiza RhD i RhCcEe-gena u uzorcima DNA oca, majke i plodne vode s pomoću lančane reakcije polimerazom. Majka fetusa bila je RhD-negativna, a otac RhD-pozitivan. Značenje pruga: M = molekularni biljeg s prugama DNA u razmaku od po 100pb; 1 = β -globin u plodnoj vodi, 110 pb (+); 2 = otac, egzon 7 RhCcEe-gena, 129 pb (+); 3 = majka, egzon 7 RhCcEe-gena, 129 pb (+); 4 = plodna voda, egzon 7 RhCcEe-gena, 129 pb (+); 5 = otac, egzon 10 RhD-gena, 193 pb (+); 6 = majka, egzon 10 RhD-gena, 193 pb (-); 7 = plodna voda, egzon 10 RhD-gena, 193 pb (-); 8 = otac, intron 4 RhD-gena, 600 pb (+) i RhCcEe-gena, 1200 pb (+); 9 = majka, intron 4 RhD-gena 600 pb (-) i RhCcEe-gena, 1200 pb (+); 10 = plodna voda, intron 4 RhD-gena, 600 pb (-) i RhCcEe-gena, 1200 pb (+)

Figure 1. Polymerase chain reaction (PCR) bands obtained in DNA samples from father, mother and amniocytes during Rh genotyping of the fourth fetus. The mother was RhD negative, and the father was RhD positive. DNA ladder bands: M = 100-bp DNA ladder, 1 = amniocyte sample β globin 110 bp (+), 2 = father-exon 7 RhCcEe gene 129 bp (+), 3 = mother-exon 7 RhCcEe gene 129 bp (+), 4 = amniocyte sample-exon 7 RhCcEe gene 129bp (+), 5 = father-exon 10 RhD gene 193 bp (+), 6 = mother-exon 10 RhD gene 193 bp(-), 7 = amniocyte sample - exon 10 RhD gene 193 bp (-), 8 = father-intron 4 RhD gene 600 bp (+) and RhCcEe gene 1200 bp (+), 9 = mother-intron 4 RhD gene 600 bp (-) and RhCcEe gene 1200 bp (+), 10 = amniocyte sample - intron 4 RhD gene 600 bp (-) and RhCcEe gene 1200 bp (+)

lekularnim biljegom od 10 do 2000 parova baza (pb), veličine pojedinačnih pruga DNA od 100 pb (Takara, Japan) (slika 1).

Na temelju učinjene analize RhD-gena postavljena je dijagnoza RhD-negativnog ploda. Citogenetskom analizom plodne vode dobiven je uredan muški kariogram (46XY). Preostali dio trudnoće protekao je uredno. Indirektni antiglobulinski test bio je pozitivan, a titar antitijela negativan. Budući da je plod bio RhD-negativan, nije došlo do kritičnog porasta količine antitijela koji bi rezultirao pozitivnim titrom. U 40. tjednu trudnoće trudnica je spontanom, vaginalnim porođajem rodila muško dijete, teško 4000 g i urednih Apgar indeksa. Krvna grupa djeteta nakon rođenja bila je 0, RhD-negativna, fenotipa Cde/ce. Dijete je imalo urednu crvenu krvnu sliku i fiziološku hiperbilirubinemiju koja je liječena fototerapijom i infuzijama te je otpušteno kući 5. dana poslije rođenja.

Rasprava i zaključci

Benet i suradnici² prvi su 1993. godine uspješno utvrdili Rh-genotip analizom stanica plodne vode s pomoću metode PCR na nizu od 15 plodova. Kad su nalaze fetalnog genotipa usporedili s fetalnim fenotipom, koji se određuje serološkom analizom RhD-antigena fetalnih eritrocita iz krvi uzete kordocentezom, pronašli su potpunu podudarnost. Danas je amniocenteza prihvaćena kao primarni postupak u određivanju fetalnoga genotipa, budući da je kordocenteza složeniji zahvat i nosi višestruko veći rizik od gubitka ploda. Biopsija kordonskih resica bila bi optimalan izbor jer bi se dijagnoza fetalnog RhD-genotipa mogla postaviti najranije.

Tablica 1. Početnice korištene kod Rh-genotipizacije
Table 1. Primers used for Rh genotyping

Početnica Primer	Gen Gene	Egzon Exon	Nukleotidni slijed Nucleotide sequence
A1	RhCcEe	7	TGTGTTGTAACCGAGTGCTG
A2	RhCcEe	7	ATTGCCGTTCAGACAGTAT
A3	RhD	10	TTAAGCAAAAGCATCCAAGA
A4	RhD	10	AATAAATGGTGAGATTCTCCTC
A9 (intron 4)	RhD	4	ACGATACCCAGTTTGCT
A6 (intron 4)	RhD	5	TGACCCTGAGATGGCTGT

No, zbog jakih fetomaternih krvarenja koje izaziva i posljedičnog porasta maternog titra antitijela treba se izbjeći. Iz istih razloga, prilikom izvođenja amniocenteze, valja izbjegavati prolaz igle kroz posteljicu.

Indikacija za amniocentezu postavlja se na osnovi utvrđivanja zgotnosti RhD-lokusa oca. U rutinskoj kliničkoj praksi ona se utvrđuje na osnovi očeva serološkog statusa (očev RhC/c i E/e-fenotip), rasne pripadnosti oca (zbog smanjene pojavnosti RhD-gena u populacijama koje nisu europskog podrijetla) te Rh-statusa njegove prethodno rođene djece.⁸ Ako je otac Rh-pozitivan homozigot, plod će također biti Rh-pozitivan, što zahtijeva daljnji nadzor trudnoće. Ako je otac Rh-pozitivan heterozigot, indicirana je amniocenteza da bi se utvrdilo je li plod Rh-negativan, za što postoji 50% šanse. Ako je plod Rh-negativan, majčina protutijela neće imati nikakvog utjecaja na plod te nije potrebno provoditi daljnju dijagnostičku obradu majke i ploda. Nadamo se da će se u skoroj budućnosti zgotnost RhD-lokusa oca određivati PCR-metodom, a ne serološki kao do sada.

Jedno opsežno ispitivanje od 347 slučajeva pokazalo je da točnost utvrđivanja RhD-statusa s pomoću analize stanica plodne vode metodom PCR iznosi 99,7%.⁹ Po mišljenju nekih autora, kad se opisanom postupkom utvrdi Rh-negativan status, nije potreban daljnji nadzor ploda.¹⁰ Međutim, opisano je nepodudaranje fetalnoga genotipa i fenotipa nakon amniocenteze u 1,5% slučajeva.¹¹ Takvo neslaganje može biti prouzročeno pogrešno navedenim očinstvom, ali i genskim preuređenjem RhD-lokusa oca koje se javlja u oko 2% slučajeva.^{4,11} Da bi se isključilo takvo neslaganje, preporučuje se provjera očeve krvi PCR-metodom s istim početnicama koje su se rabile u analizi stanica plodne vode. Ako očinstvo nije poznato ili otac djeteta nije dostupan, mogućnost lažno negativnog nalaza može se provjeriti serijskim određivanjem titra antitijela. Naime, ako je plod stvarno Rh-negativan, onda je mogućnost neznatnog porasta titra zbog anamnestičke reakcije samo 2%. Ako se zabilježi višestruki porast titra, onda se mora provjeriti točnost RhD-negativnog rezultata koji je dobiven PCR-analizom stanica plodne vode. Tada je najsvrhovitije učiniti kordocentezu i utvrditi RhD-status ploda s pomoću seroloških ispitivanja, ili ponoviti amniocentezu i analizu stanica plodne vode.

Posljednjih godina u nekim se europskim centrima provodi neinvazivna prenatalna RhD-genotipizacija ploda s pomoću izoliranja i umnožavanja fetalne DNA iz plazme Rh-negativnih majki, što je metoda s potvrđeno visokom osjetljivošću i specifičnošću.^{2,12,13} Prema Danielsu,¹⁴ točnost

te metode je između 90% i 100%. Mogućnost lažno negativnih nalaza postoji ako se uzorci uzimaju u prvom tromjesečju trudnoće, vjerojatno zato što je količina fetalne DNA koja tada postoji vrlo mala.^{12,14}

Smatramo da bi opisanoj tehnici utvrđivanja fetalnog RhD-genotipa trebalo uvesti u sve tercijarne centre u Hrvatskoj s ciljem da postane sastavni dio budućeg postupka. Pravovremena prenatalna dijagnoza RhD-negativnog ploda eliminirat će nepotrebne kontrole i laboratorijska testiranja trudnice te nesvrhovite amniocenteze i kordocenteze. Štoviše, u skoroj budućnosti očekujemo da se u Hrvatskoj uvede tehnika fetalne RhD-genotipizacije izravno iz seruma majki.

LITERATURA

1. Mari G, Deter RL, Carpenter RL i sur. Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. Collaborative Group for Doppler Assessment of the Blood Velocity in Anemic Fetuses. *N Engl J Med* 2000;342:9–14.
2. Bennett PR, Le Van Kim C, Colin Y i sur. Prenatal determination of fetal RhD type by DNA amplification. *N Engl J Med* 1993;329:607–10.
3. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF i sur. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485–7.
4. Colin Y, Cherif-Zahar B, Le Van Kim C, Taynal V, Cherrier C, Cartron JP. Genetic basis of RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. *Blood* 1991;78:2747–52.
5. Hromadnikova I, Vechetova L, Vesela K i sur. Non-invasive fetal RhD exon 7 and 10 genotyping using real-time PCR testing of fetal DNA in maternal plasma. *Fetal Diagn Ther* 2005;20(4):275–80.
6. Clausen FB, Krog GR, Rieneck K i sur. Reliable test for prenatal prediction of fetal RhD type using maternal plasma from RhD negative women. *Prenat Diagn* 2005;25(11):1040–4.
7. Moise KJ Jr, Carpenter RJ Jr. Chorionic villus sampling for Rh typing: Clinical implications (letter). *Am J Obstet Gynecol* 1993;168:1002–3.
8. Kanter MH. Derivation of new mathematic formulas for determining whether a D-positive father is heterozygous or homozygous for the D antigen. *Am J Obstet Gynecol* 1992;166:61–3.
9. Dildy GA, Jackson GM, Ward K. Determination of fetal RhD status from uncultured amniocytes. *Obstet Gynecol* 1996;88:207–10.
10. Cotorruella C, Biondi C, Garcia Borrás C, Di Monaco R, Racca A. Early detection of RhD status in pregnancies at risk of hemolytic disease of the newborn. *Clin Exp Med* 2002;2:77–81.
11. Van der Ceyver IB, Moise KJ Jr. Fetal Rh D typing by polymerase chain reaction in pregnancies complicated by rhesus alloimmunisation. *Obstet Gynecol* 1996;88:1061–7.
12. Lo YM, Hjelm NM, Fidler C i sur. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med* 1998;339:1734–8.
13. Faas BH, Beuling EA, Christiaens GC, von dem Borne AE, van der Schoot CE. Detection of fetal RhD specific sequences in maternal plasma. *Lancet* 1998;352:1196.
14. Daniels G, Finning K, Martin P, Soothill P. Fetal blood group genotyping from DNA from maternal plasma: an important advance in the management and prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn. *Vox Sang* 2004;87:225–32.