

DETERMINAZIONE PRENATALE NON INVASIVA NEL PRIMO TRIMESTRE DI GRAVIDANZA SU PLASMA MATERNO DEL RHD FETALE MEDIANTE REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION: UNA ESPERIENZA ITALIANA

Danila Morano^a, Ambra Girardi^b, Francesco Carinci^c, Alfredo Patella^a

^aClinica Ostetrico Ginecologica, Università degli Studi di Ferrara, Azienda Ospedaliero Universitaria di Ferrara

^bDipartimento di Istologia, Embriologia e Biologia Applicata, Università degli studi di Bologna

^cMaxillofacial Surgery Basic Sciences Lab., Scuola di Specializzazione in Chirurgia Maxillofacciale della Università degli Studi di Ferrara

Indirizzo per corrispondenza: Dott.ssa Danila Morano

Clinica Ostetrico Ginecologica, Azienda Ospedaliero Universitaria di Ferrara

Corso Giovecca 203, 44121 Ferrara (FE) Italia

tel: +39 347 9428905; fax: +39 0532 236297; e-mail: danila_morano@hotmail.com

ABSTRACT

Objective: Prenatal non invasive determination of fetal Rh status is an important aid to the management of haemolytic disease of the fetus and newborn. We performed real-time polymerase chain reaction on fetal DNA derived from maternal plasma to determine fetal Rh status. **Study design:** Cell-free plasma DNA from 11 D-negative pregnant women was tested for the presence of exons 4, 5, and 10 of RHD. The presence of fetal DNA was confirmed by detection of SRY. **Results:** Two D-positive infants and Four D-negative infants were determined by serologic studies. All 3RHD exon sequences were detected D-positive infants (N=2). In 7 of our 11 cases a correct determination of fetal sex was done by serologic studies. **Conclusion:** Fetal RHD genotyping in this study correctly predicted fetal Rh status in 6 of 11 (54 %) cases, and Fetal Sex in this study was correctly predicted in 63% of cases (7/11). Actually in Italy it is not in use a routine protocol for the non invasive determination of Fetal Rh status. This study represents one of the first Italian experience in this matter.

Key words: *Genotyping; RhD*

RIASSUNTO

Obiettivo: Determinazione prenatale non invasiva di Rh fetale nel primo trimestre di gravidanza come importante ausilio al management della malattia emolitica del feto e del neonato. Sarà utilizzata la Real time PCR sul DNA fetale derivato da plasma materno per determinare lo status Rh fetale. **Disegno dello studio:** Sul DNA plasmatico libero proveniente da 11 donne Rh negative nel primo trimestre di gravidanza si ricercherà la presenza degli esoni 4,5 e 10 del gene RhD. La presenza di DNA fetale verrà confermata (almeno per i feti maschi) dalla presenza del gene SRY nel plasma materno. **Risultati:** In 7 degli 11 casi è stata fatta diagnosi corretta di sesso fetale. In 6 degli 11 casi è stata fatta diagnosi corretta di Rh. Tra questi 6, nei due neonati Rh positivi sono stati correttamente amplificati tutti e tre gli esoni considerati. In 5 su 11 dei nostri casi entrambe le diagnosi sono risultate corrette. **Conclusioni:** La determinazione del Rh fetale in questo studio è stata correttamente effettuata in 6 degli 11 casi considerati (54 %), mentre la diagnosi corretta di sesso fetale è stata effettuata nel 63% dei casi (7/11). In Italia non esiste ancora un protocollo routinario per la diagnosi non invasiva di RhD. Il nostro rappresenta quindi una delle prime esperienze italiane in questo campo diagnostico.

Parole chiave: *Tipizzazione; RhD*

INTRODUZIONE

La situazione che determina l'anemia emolitica fetalee neonatale (MEN) è la produzione da parte materna di anticorpi IgG, in grado attraversare la placenta, diretti contro antigeni eritrocitari del feto non posseduti dalla

madre. La produzione anomala avviene al momento del primo contatto con gli antigeni eritrocitari non posseduti dalla donna, in genere al momento del parto, anche se si conoscono altre cause, quali ad esempio trasfusioni di sangue incompatibile. La produzione si riattiva nelle gravidanze successive se il feto esprime tali antigeni.

Sui globuli rossi sono presenti numerosi antigeni classificati in oltre 30 gruppi. Non tutti gli antigeni presentano lo stesso rischio di determinare una malattia emolitica fetoneonatale. Per alcuni di essi vi è un rischio alto di causare una malattia emolitica (D,c,E del sistema RH; antigene K del sistema kell) mentre per altri, seppur in presenza di anticorpi materni non è mai stato segnalato nessun caso. Gli anticorpi materni, una volta attraversata la placenta, si legano agli eritrociti fetali formando un rivestimento sulla superficie e determinandone una emolisi accelerata da parte dei macrofagi del sistema reticoloendoteliale fetale. Tale processo si verifica soprattutto a livello della milza e del fegato. L'emolisi determina:

- 1) un incremento dei prodotti del catabolismo emoglobinico, come la bilirubina, sia nel circolo fetale che nel liquido amniotico;
- 2) una intensa stimolazione dell'eritropoiesi, dapprima intramidollare (con produzione di reticolociti) quindi anche extramidollare (con produzione di eritroblasti), a livello del fegato, della milza, dei reni e in altre sedi;
- 3) anemizzazione, che si manifesta quando l'emolisi supera le capacità di compenso del feto.

L'immunoprofilassi, che viene da tempo routinariamente usata nella profilassi antenatale, ha determinato una riduzione dal 13.2 allo 0.14% dell'incidenza di alloimmunizzazione anti D (1,2). Tuttavia la Malattia emolitica del feto e del neonato (MEN) causata da anticorpi anti D è ancora una problematica attuale, specialmente nelle pazienti immigrate e nomadi, soprattutto per dosaggio inadeguato in caso di emorragia fetomaterna importante o ritardo nella somministrazione delle immunoglobuline. Ecco perché, in alcuni paesi europei, come l'Inghilterra, la profilassi anti D routinaria antenatale è stata introdotta per tutte le donne Rh negative nel terzo trimestre di gravidanza (oltre che dopo il parto). Tuttavia è certo che, in tal modo, circa il 40% delle donne Rh negative (che partoriscono un neonato a sua volta D negativo), riceveranno una immunoprofilassi anti D non necessaria (11). Questo determina un costo aggiuntivo superfluo sul servizio sanitario nazionale oltre ad esporre la donna al rischio associato alla somministrazione di derivati di sangue umano. Il confronto dei percorsi esistenti con le esperienze della letteratura e con le linee guida delle società scientifiche, ha prodotto un protocollo, ormai internazionalmente condiviso, che seleziona i seguenti momenti nel percorso assistenziale:

- screening in gravidanza comprendente la determinazione del gruppo sanguigno completo nella madre e la ricerca di allo anticorpi da eseguire in

momenti diversi a seconda della presenza o meno dell'antigene.

- monitoraggio in donna con alloimmunizzazione attraverso la identificazione del/degli anticorpi e la loro titolazione. La tipizzazione del padre è riservata alla valutazione del rischio di MEN prenatale.
- prevenzione dell'immunizzazione: immunoprofilassi antenatale e al parto e controllo dell'emorragia fetomaterna.

Lo studio immunoematologico della donna e del coniuge deve prevedere la corretta definizione del gruppo ABO, fenotipi RH e la ricerca degli allo-anticorpi anti-eritrociti (Test di Coombs indiretto), la definizione della specificità dell'alloanticorpo rilevato e la sua titolazione (nella maggior parte dei centri viene considerato significativo un titolo superiore o uguale a 1:16 in caso di alloimmunizzazione da qualsiasi tipo di antigene con la sola eccezione del Kell). Lo studio nel coniuge del fenotipo di eventuali antigeni coinvolti nell'alloimmunizzazione della donna. È ovvio che se il padre del feto è Rh D negativo, il feto non è a rischio di malattia emolitica. Se il padre è RhD positivo, sarà necessaria una ulteriore indagine degli antigeni C ed E del sistema Rh, per poter predire la probabilità di omozigosi per RhD (3,4,5,6). Quando il partner non è conosciuto o irreperibile o non certo, o il fenotipo Rh paterno può determinare una probabilità di eterozigoti per RhD, quindi il feto è a rischio di malattia emolitica. Ogni controllo deve essere caratterizzato dalla raccolta di dati anamnestici della donna in gravidanza che mirano a verificare l'età gestazionale e precedenti eventi immunizzanti.

Attualmente l'ecografia consente la diagnosi di anemia fetale severa caratterizzata dalla comparsa di ascite, versamento pericardico fino alla idrope che dovrebbe essere considerata lo stadio finale della malattia emolitica in quanto si manifesta quando i valori di emoglobina sono 1/3 di quelli attesi per l'epoca. Negli anni, si è cercato di identificare dei parametri ecografici e Doppler velocimetrici in grado di sostituire la misurazione del delta OD450 sul liquido amniotico, ossia in grado di essere indicativi di forme anche lievi di anemia fetale, che precedano la comparsa dell'idrope.

In generale, tutti questi parametri si sono rivelati poco sensibili e scarsamente riproducibili, con l'eccezione della velocità di picco sistolico a livello della arteria cerebrale media (ACM). Le arterie cerebrali rispondono rapidamente all'ipossia, a causa della stretta dipendenza del tessuto cerebrale dall'ossigeno. Nei feti anemici, il calo dell'ematocrito porta ad una riduzione della viscosità del sangue e dell'apporto di ossigeno ai tessuti; il feto cerca di mantenere una ossigenazione adeguata

e l'equilibrio metabolico nei vari organi aumentando l'output cardiaco e la vasodilatazione: il circolo diventa iperdinamico. Attraverso l'applicazione di una formula matematica è possibile predire l'emoglobina fetale, basandosi sulla velocità di picco della ACM; in tale formula, sia la velocità di picco che l'emoglobina sono espresse come multipli della mediana (MoM) in quanto si tiene conto che sono parametri che si modificano in rapporto all'epoca gestazionale.

Il riscontro di valori di velocità di picco sistolico nella ACM pari a 1,5 MoM rappresenta una indicazione alla funicolocentesi e alla eventuale trasfusione intrauterina. Una alternativa, proposta da alcuni autori, all'utilizzo della velocità di picco nella ACM al fine di decidere quando effettuare una procedura invasiva è quella di attendere la comparsa di ascite fetale. L'obiettivo di questo approccio è quello di ridurre il numero di procedure invasive (funicolocentesi e trasfusioni intrauterine) che sono associate ad un significativo rischio di perdita fetale nonché di altre complicanze quali ematoma del funicolo, trombosi della vena ombelicale, bradicardia fetale, e sono per definizione una potenziale causa di immunizzazione. Attualmente il gold standard per la sorveglianza in gravidanza è rappresentato dalla valutazione della velocimetria Doppler in ACM, indicato in questo caso per titoli anticorpali >1:2 e con frequenza settimanale. L'avvento di una diagnosi prenatale non invasiva che utilizza il DNA fetale libero per determinare RH fetale offre un potenziale significativo di cambiamento del management delle donne Rh negative in gravidanza. Nel 1997 Lo et al (8) hanno dimostrato che circa il 3-6% di DNA libero nel sangue delle donne gravide è di origine fetale usando una PCR convenzionale per specifiche sequenze del cromosoma Y. Poiché il gene RHD è completamente assente nel genoma delle gravide Rh negative, il trovare specifiche sequenze del gene RhD è concettualmente simile al trovare sequenze di cromosoma Y in un background genetico femminile (7,8,9). La amplificazione delle sequenze del gene D si effettua tramite le real time polymerase chain reaction (RT-PCR) sul sangue materno, uno strumento in grado di quantificare un segnale fluorescente di una sonda avente una sequenza di basi nota. Tale macchinario fornisce informazioni sia sulla presenza che sulla quantità di gene. La amplificazione delle sequenze RhD non è cosa di poco conto. Dato che non esistono sequenze specifiche degli esoni (si ricorda che il sistema D e CE hanno dieci esoni ciascuno) in grado di amplificare correttamente senza falsi positivi, la diagnosi corretta di RhD fetale viene posta amplificando in contemporanea più sequenze di più esoni. Inoltre esistono alcuni pseudo geni in grado di produrre un segnale falso positivo. I più frequenti

sono lo pseudogene RhD-Ψ: si tratta di un RhD completo con una duplicazione di 37-bp nell'esone 4 e una mutazione non-senso nell'esone 6, e l'RhD-CE-D, un gene ibrido fra D ed CE (esoni 1, 2, e 3' term dell'esone 3 del gene RhD. 5' term dell'esone 3 ed esoni 4-7 del gene RhCE. Esoni 9 e 10 dell' RhD). Nella letteratura sono presenti varie combinazioni di sequenze presenti su varie esoni la cui amplificazione prevede di escludere o di identificare correttamente la presenza di un segnale RhD proveniente dal feto (8,11,12). L'esone 5 ad esempio non si amplifica in caso di RhD-Ψ mentre la combinazione 4,5 e 10 assieme al gene SRY (usato per verificare se si tratta di feto maschio o femmina) produce una sensibilità prossima al 100%. Una metanalisi su 744 casi a 11-37 settimane di gravidanza ha evidenziato che attualmente la diagnostica per l'RhD è del 99% (17).

Tuttavia, l'amplificazione è settimana-dipendente: è possibile confondere un segnale materno con quello fetale. Ampi studi presenti in letteratura hanno testato DNA fetale libero a 28-30 settimane (13,14,15,16,17), comparando i risultati con RhD testato sierologicamente su sangue di cordone (prelevato routinariamente alla nascita). Questi risultati suggeriscono che una ottima tipizzazione Rh D fetale è possibile nel secondo-terzo trimestre di gravidanza. Tuttavia poiché la prima dose di routine di immunoprofilassi è data a 28 settimane in molti paesi europei, ed è data per ogni evento traumatico dopo la dodicesima settimana, un test effettuato diagnostico non invasivo per RhD a 28 settimane è già tardivo.

Ancora molti studi sono necessari per determinare la sensibilità nella gravidanza iniziale, quando cioè la concentrazione di DNA fetale libero è più bassa.

MATERIALI E METODI

Questo studio è stato approvato dal Comitato Etico della Azienda Ospedaliero- Universitaria di Ferrara. Campioni di sangue in EDTA (7 ml) sono stati prelevati da pazienti gravide (N=11), di diverse etnie, con feto singolo, Rh negative, presso la Clinica Ostetrica dell'Azienda Ospedaliero- Universitaria di Ferrara, nel primo trimestre di gestazione.

Per tutte le pazienti è stato richiesto presso il Centro Trasfusionale della Azienda Ospedaliero- Universitaria di Ferrara una valutazione del gruppo ABO, una tipizzazione Rh con eventuale ricerca di anticorpi irregolari (Test di Coombs Indiretto). Presso il MAXILLO-FACIAL SURGERY BASIC SCIENCES LAB della Scuola di Specializzazione in Chirurgia Maxillofaciale dell'Università degli Studi di Ferrara il plasma materno è stato separato dalla componente cellulare (Buffy

Coat) mediante centrifugazione (3000×g, room temperature) ed il sopranatante trasferito in provette di polipropilene e congelato -20°C. La identificazione del ABO e del Rh dei neonati è stata effettuata sul sangue cordonale dopo il parto delle donne arruolate nel nostro studio presso il Centro Trasfusionale della Azienda Ospedaliero -Universitaria di Ferrara. È stata effettuata la verifica della concordanza tra lo stato Rh del neonato determinato dalla sierologia su sangue cordonale ed l'analisi del genotipo fetale effettuata su sangue materno. I feti sono stati giudicati Rh D positivi quando è stato amplificato un segnale relativo ad RhD esone 4, RhD esone 5, e RhD esone 10. I feti sono stati giudicati Rh D negativi quando nessuno di questi segnali è stato amplificato. Non è stata attribuita una tipizzazione RhD certa se solo uno o due degli esoni veniva amplificato. Il gene umano chiamato *SRY* (sex-determining region of the Y chromosome), in grado di attivare il differenziamento maschile delle gonadi, è stato contemporaneamente ricercato ed amplificato come ulteriore conferma che il DNA estratto è di origine fetale e non materna. Il metodo di amplificazione delle sequenza di acido nucleico relative agli esoni RHD considerati è stata la PCR (Polymerase Chain Reaction). Il DNA è stato amplificato mediante real time PCR quantitativa relativa eseguita su ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems), in presenza di una miscela di reazione contenente Taqman Universal PCR Master Mix, primers e sonda TaqMan MGB specifici per i geni oggetto di studio. L'analisi quantitativa dell'espressione dei geni oggetto di studio è stata valutata in rapporto ad un gene housekeeping.

Estrazione del DNA

Il DNA è stato estratto dal plasma usando QIA-amp Blood Kit (Qiagen, Valencia, CA) in accordo con il protocollo relativo al sangue e liquidi biologici dell'azienda produttrice. Ottocento microlitri di plasma sono stati utilizzati per colonna per l'estrazione del DNA. Il DNA è stato diluito in 50 µl di acqua e congelato a -20°C.

Real-time PCR

L'analisi Real Time PCR usando il Taqman assay format è stata effettuata su ABI PRISM 7900 instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA). Le sonde molecolari TaqMan (Applied Biosystems) per l'esone 4 RHD exon 4 ed il gene SRY sono state marcate al 50-terminale con la Carbossifluoresceina (reporter dye 6-FAM). Le sonde molecolari per gli esoni 5 e 10 sono state marcate al 50-terminale con Fluorocromo dye VIC. Tutte le sonde Taqman sono state marcate al 30-terminale con 6 Carbossi-tetrametilrodamina (TAMRA). I primers usati per questo studio avevano

come bersaglio gli esoni 4,5 e 10 del gene RHD ed il gene SRY gene (14,15).

I primers per il gene GAPD sono stati usati con controllo interno per l'amplificazione del DNA. Tutti i primers sono stati acquistati dall' Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa). Cinque microlitri di DNA estratto sono stati amplificati in un volume di reazione di 25 µl usando il TaqMan Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems). Tutte le sonde molecolari sono state usate a 100 nmol/L e le concentrazioni dei primers sono di 200 nmol/L (RHD esone 4, RHD esone 10, e SRY) o 300 nmol/L (RHD esone 5). Le amplificazioni degli esoni 4 - 10 ed esone 5-SRY sono state effettuate in duplex PCR. Per ogni esperimento, 100 pg di DNA isolato da una paziente D-positiva ed una D-negativa sono stati utilizzati rispettivamente come controllo positivo e controllo negativo. I risultati sono stati analizzati con l'uso della Sequence Detection Software version 2.1 (Applied Biosystems) secondo le linee guida della ditta produttrice.

Gli oligonucleotidi e le probes impiegate nel nostro studio in Real-Time PCR sono stati (14,15,27:

1) RHD exon 4 EX4F CTGCCAAAGCCTCTACAGG
EX4R ATGGCAGACAAACTGGGTGTC*
EX4P TTGCTGTCTGATCTTTATCCTCCGTTCCCT

2) RHD exon 5 EX5F CGCCTCTTCTGTGGATG*
EX5R GAACACGGCATTCTTCCTTTC
EX5P TCTGGCCAAGTT*TCAACTC*TGCTCGCT

3) RHD exon 10 EX10F CCTCTCACTGTTGCCTGCATT
EX10R AGTGCCTGCGCGAACATT
EX10P (FAM) TACGTGAGAAACGCTCATGACAGCAAAGTCT

Le basi sottolineate sono mismatch, usati per aumentare la specificità dei primers. Le basi in grassetto distinguono RhD da RHCE. Le basi con asterisco distinguono RhD da RhD Ψ.

4) SRY SRY F TGGCGATTAAGTCAAATTTCGC
SRY R CCCCCTAGTACCCTGACAATGTAT
SRY P AGCAGTAGAGCAGTCAGGGAGGCAGA

RISULTATI

Un totale di 11 campioni di plasma sono stati prelevati da donne gravide Rh D negative: 1 donna di colore e 10 donne caucasiche. Cinque di queste donne erano a meno di 14 settimane di gestazione al momento

del prelievo, quattro erano tra le 16 e 18 settimane ed una sola alla 22 settimana di gestazione. Al momento della nascita e' stato effettuato. La identificazione del ABO e del Rh dei neonati e' stata effettuata sul sangue cordonale dopo il parto delle donne arruolate nel nostro studio presso il Centro Trasfusionale della Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara (Tabella I e Tabella Ia). Non sono state prese in considerazione gravidanze gemellari nel nostro studio.

TABELLA I		
D-positivi	Maschi	2
	Femmine	3
D-negativi	Maschi	4
	Femmine	2
Totale		11

TABELLA Ia				
Emogruppo materno	Emogruppo paterno	Emogruppo fetale	Sesso fetale	Rh e Sesso fetale su plasma materno
0-	0+	0+	Femminile	F/Rh +
0-	0-	0-	Femminile	F /Rh-
0-	0-	0-	Maschile	F ?
0-	0+	0+	Maschile	F ?
B-	A+	Ab+	Femminile	F/Rh-
0-	A+	A -	Femminile	F /Rh-
A-	B+	Ab+	Femminile	F/Rh+
0-	0-	0-	Maschile	M/Rh-
A-	A-	A-	Maschile	M/Rh+
B-	A+	A+	Maschile	F?
A-	B-	A-	Maschile	F/Rh-

In 7 degli 11 casi (63%) e' stata fatta diagnosi corretta di sesso fetale. In 6 degli 11 casi (54%) e' stata fatta diagnosi corretta di Rh fetale su plasma materno. In 5 su 11 dei nostri casi entrambe le diagnosi di sesso ed Rh sono risultate corrette (Tabella Ia). In tre casi su 11(27%) non e' stato possibile attribuire una tipizzazione RhD o per mancata amplificazione di tutti gli esoni di RhD e di SRYo per amplificazione di uno solo o due degli esoni RhD senza amplificazione di SRY. In questo numero di casi dichiarati inconclusivi anche i primers per il gene GAPD, utilizzati come controllo interno per l'amplificazione del DNA, non sono stati suscettibili di amplificazione. Questa condizione e' suggestiva di un risultato falso negativo legato ad una insufficiente quantita' di DNA presente nella specifica colonna di

analisi . Fin dall'inizio dell'applicazione della PCR real time a questo scopo diagnostico il problema e' sempre stata l'individuazione di metodi volti a ridurre il numero di falsi positivi e falsi negativi. Un problema con i set di prima generazione che utilizzavano l'esone 4,7 o 10 , e' che erano disegnati da ricercatori che non avevano molta familiarita' con la struttura del gene RH e realizzati sulla base dell' assunzione che il gene RH e' completamente assente negli individui RH negativi. Sfortunatamente il sistema RH e' complesso ed un certo numero di sierotipi D negativi contiene intatto il gene per RH. Questo e' il caso dei soggetti africani portatori dello pseudogene . Un'altra variante del gene Rh che porta a risultati falsamente positivi e che e' relativamente comune nelle donne africane D negative

(22% di D negativi afro americani) e' il gene RHD-CE-D, un ibrido del gene RhD che comprende gli esoni 1,2 ed il 50% terminale dell'esone 3 del gene RHD, assieme ad il 50% terminale degli esoni 3,4,7 del gene RHCE , ed inoltre gli esoni 9 e 19 del gene RHD. Ecco perche' il SAFE Network (Special Non-Invasive Advances in Fetal and Neonatal Evaluation) Europeo ha ampiamente raccomandato l'uso di sonde specifiche dell'esone 5 disegnate in modo da non dare alcun prodotto di amplificazione in presenza di un RHD pseudogene. Tuttavia non puo' ancora essere esclusa la possibilita' di risultati falsi positivi in presenza di alleli RHD rari in soggetti

D negativi.

Ancora risultati falsi positivi possono essere dovuti alle varianti RHD o alla possibile persistenza di DNA trofoblastico da una iniziale gravidanza gemellare ('vanishing twin'). Tuttavia mentre in caso di un risultato falso positivo la conseguenza peggiore potrebbe essere quella di trattare la madre con una immunoprofilassi non necessaria, il piu' importante impatto clinico e' rappresentato dalla discordanza in termini di falsi negativi ossia alla mancata somministrazione di immunoprofilassi necessaria.

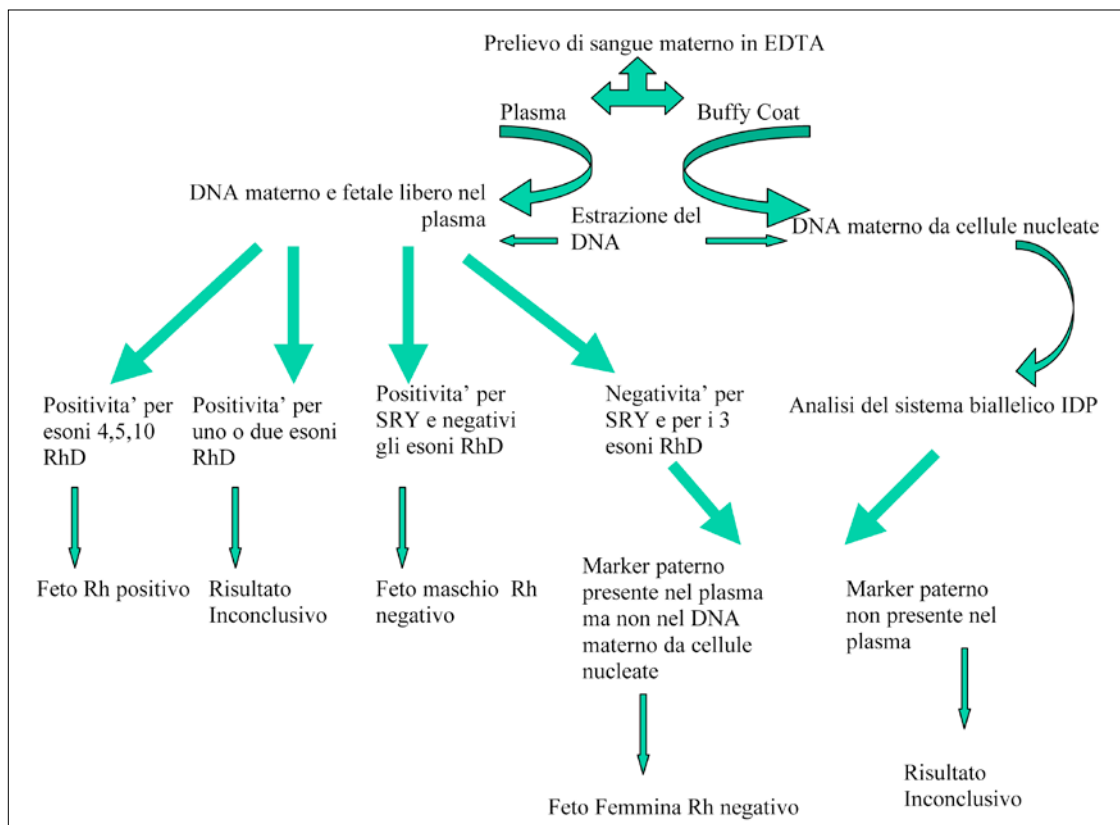
Questo problema potrebbe presentarsi in seguito al fallimento dell'amplificazione del DNA fetale libero. Per confermare la presenza di DNA fetale libero si ricorre alla simultanea amplificazione delle sequenze specifiche per SRY. Ma ,in caso di negativita' per entrambe le

sequenze geniche, e' necessario utilizzare un ulteriore set di markers per confermare la presenza di DNA fetale libero. L'utilizzo contemporaneo di primers specifici per RHD e SRY in associazione all'analisi di polimorfismi da inserzione/delezione biallelica (IDP) e' stato riconosciuto essere il miglior metodo per confermare la presenza di DNA fetale libero in una colonna di analisi (13). Il sistema biallelico IDP utilizza la determinazione di alleli di origine paterna nel plasma materno (14). L'assenza di un allele IDP nel buffy coat materno, generato dalla separazione dal plasma su cui e' stata effettuata l'analisi con PCR, e la presenza del medesimo allele IDP nel plasma materno conferma la presenza di DNA fetale e, quindi il risultato della tipizzazione Rh puo' essere riportato con maggior certezza (19,20,21). Nel nostro caso non essendo disponibile il sangue paterno, non e' stata possibile eseguire l'analisi del sistema biallelico IDP. Piu' recentemente Chan et al. hanno descritto che la presenza di una sequenza di DNA detta RASSF1 puo' essere usata come markers fetale universale (26). Per quest'ultima indagine non eravamo in possesso della tecnologia necessaria. E' possibile quindi elaborare un algoritmo per la determinazione del RhD fetale da plasma materno che, introducendo in sequenza metodi di indagine piu' raffinata, aumenta la sensibilita' del metodo e riduce il numero dei falsi negativi (27)(Figura 1):

CONCLUSIONI

L'introduzione della diagnosi prenatale non invasiva usando il DNA fetale libero ha determinato una rivoluzione nel management di molti aspetti della medicina prenatale. Nel caso della diagnosi prenatale non invasiva del RhD fetale, ad esempio, questa tecnologia impattera' il management del 15% delle donne gravide della popolazione occidentale che sono D negative. La tipizzazione del RhD fetale rendera' piu' semplice il management delle gravidanze ad alto rischio di Malattia Emolitica Neonatale (MEN), ovviando alla necessita' di test diagnostici invasivi ed individuando il preciso target delle gravidanze che necessitano di uno stretto monitoraggio. La tipizzazione precoce del RhD fetale portera' ad una riduzione della somministrazione di antiD, minore esposizione a derivati del sangue umano e diminuzione dei costi economici delle amministrazioni sanitarie pubbliche e private. Infatti, anche se molti degli studi iniziali hanno utilizzato procedure di estrazione manuale del DNA fetale libero e per le successive PCR, l'intero processo e suscettibile di automazione rendendo la procedura meno costosa e quindi accessibile come screening delle gravidanza ad alto rischio di MEN. piuttosto che continuare la pratica della immunoprofilassi di routine. In Francia ed Olanda e' diventata ormai una pratica comune, con costi coperti dal servizio sanitario nazionale. In Italia non esiste ancora un protocollo routinario per la diagnosi non invasiva di RhD. Il nostro rappresenta quindi una delle prime esperienze italiane in questo campo diagnostico.

Figura 1



Referenze bibliografiche

1. Bowman JM. *Thirty-five years of Rh prophylaxis*. *Transfusion* 2003;43:1661-6.
2. Hughes RG, Craig JI, Murphy WG, Greer IA. *Causes and clinical consequences of Rhesus (D) haemolytic disease of the newborn: a study of a Scottish population, 1985-1990*. *BJOG* 1994;101:297-300.
3. Turner WA, Fadel HE, Krauss JS Jr. *Detection and quantitation of fetomaternal hemorrhage*. *South Med J* 1986;79:571-5.
4. Hartwell EA. *Use of Rh immune globulin: ASCP practice parameter*. American Society of Clinical Pathologists. *Am J Clin Pathol* 1998;110:281-92.
5. Judd WJ. *Practice guidelines for prenatal and perinatal immunohematology, revisited*. *Transfusion* 2001;41:1445-52.
6. Moise KJ Jr. *Management of Rhesus alloimmunization in pregnancy*. *Obstet Gynecol* 2002;100:600-11.
7. Moise KJ Jr. *Rh disease: it's still a threat*. *Contemp Obstet Gynecol* 2004;49:34-48.
8. 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;350:485-7.
9. Avent ND, Finning KM, Martin PG, Soothill PW. *Prenatal determination of fetal blood group status [review]*. *Vox Sang* 2000;78:155-62.
10. van der Schoot CE, Soussan AA, Dee R, Bonsel GJ, de Haas M. *Screening for foetal RHD-genotype by plasma PCR in all D-negative pregnant women is feasible*. *Vox Sang* 2004;87:9.
11. Rijnders RJ, Christiaens GC, Bossers B, van der Smagt JJ, van der Schoot CE, de Haas M. *Clinical applications of cell-free fetal DNA from maternal plasma*. *Obstet Gynecol* 2004;103:157-64.
12. Lo YM, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, et al. *Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma*. *N Engl J Med* 1998;339:1734-8.
13. Douc-Drnousek T, Bricl I, Finning K, Blejec T, Potocnik M, Rozman P. *Prenatal determination of fetal RhD status from maternal plasma using real-time PCR*. *Vox Sang* 2004;84:131.
14. Finning KM, Martin PG, Soothill PW, Avent ND. *Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new non-invasive fetal RHD genotyping service*. *Transfusion* 2002;42:1079-85.
15. Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM. *Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis*. *Am J Hum Genet* 1998;62:768-75.
16. 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;17:31-44.
17. Zhong XY, Burk MR, Troeger C, Kang A, Holzgreve W, Hahn S. *Fluctuation of maternal and fetal free extracellular circulatory DNA in maternal plasma*. *Obstet Gynecol* 2000;96:991-6.
18. Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. *Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma*. *Am J Hum Genet* 1999;64:218-24.
19. Randen I, Hauge R, Kjeldsen-Kragh J, Fagerhol MK. *Prenatal genotyping of RHD and SRY using maternal blood*. *Vox Sang* 2003;85:300-6.
20. Nelson M, Eagle C, Langshaw M, Popp H, Kronenberg H. *Genotyping fetal DNA by non-invasive means: extraction from maternal plasma*. *Vox Sang* 2001;80:112-6.
21. Costa JM, Giovangrandi Y, Ernault P, Lohmann L, Nataf V, El Halali N, et al. *Fetal RHD genotyping in maternal serum during the first trimester of pregnancy*. *Br J Haematol* 2002;119:255-60.
22. Dhallan R, Au WC, Mattagajasingh S, Emche S, Bayliss P, Damewood M, et al. *Methods to increase the percentage of free fetal DNA recovered from the maternal circulation*. *JAMA* 2004;291:1114-9.
23. Benachi A, Yamgnane A, Olivi M, Dumez Y, Gautier E, Costa JM. *Impact of formaldehyde on the in vitro proportion of fetal DNA in maternal plasma and serum*. *Clin Chem* 2005;51:242-4.
24. Orzinska A, Guz K, Brojer E, Z' upan' ska B. *Foetal RHD gene detection in plasma samples of RhD-negative pregnant women*. *Vox Sang* 2004;87:80.
25. Moise KJ. *Fetal RhD typing with free DNA in maternal plasma*. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192:663-5.
26. Chan KCA, Zhang J, Hui ABY, et al. *Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma*. *Clin Chem* 2004;50:88-92.
27. Zhou L. *Noninvasive prenatal RHD genotyping by real-time polymerase chain reaction using plasma from D-negative pregnant women*; *Am.J.Ob Gyn* (2005) 193, 1966-71