

P R A C E O R Y G I N A L N E
położnictwo

Diagnostyczna przydatność detekcji genu *RHD* w osoczu ciężarnych w profilaktyce konfliktu matczyno- płodowego na tle antygenu D z układu Rh

Diagnostic utility of *RHD*-gene detection in maternal plasma in the prophylaxis of feto-maternal Rh-incompatibility

Agnieszka Sapa¹, Anna Jonkisz², Mariusz Zimmer^{3,4}, Artur Kłósek⁴, Mieczysław Woźniak¹

¹ Zakład Chemii Klinicznej, Katedra Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Polska

² Zakład Techniki Molekularnych, Katedra Medycyny Sądowej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Polska

³ II Katedra i Klinika Ginekologii i Położnictwa, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Polska

⁴ Klinika Ginekologii i Położnictwa Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu, Polska

Streszczenie

Cel pracy: Celem badań była walidacja oraz wstępna ocena przydatności testu do prenatalnego określania genu *RHD* pochodzenia płodowego w osoczu ciężarnej w rutynowej praktyce laboratoryjnej i klinicznej. Wprowadzenie do diagnostyki nieinwazyjnych badań prenatalnych ma na celu bardziej racjonalne i bezpieczne stosowanie immunoprofilaktyki.

Materiał i metody: Badanie genu *RHD* w osoczu ciężarnych wykonano techniką real-time PCR z zastosowaniem starterów i sond specyficznych do sekwencji eksonów 7 i 10 genu *RHD*. Wyniki ujemne badania na obecność genu *RHD* weryfikowano dodatkowymi testami, które miały na celu potwierdzenie udanej izolacji i obecności DNA płodowego w próbce. W pierwszej kolejności wykonywano oznaczenie markera płci męskiej (genu *SRY*), które potwierdzało obecność DNA w przypadku płodów płci męskiej. Badanie wykonywano testem Quantifiler[®] Duo. Próbkę z ujemnym wynikiem poddawano dalszej analizie poprzez oznaczanie polimorfizmów typu STR (ang. short tandem repeat) metodą mini SGM, różnicując DNA pochodzenia matczynego i płodowego.

Wyniki: Dokładność diagnostyczna testu do oznaczania genu *RHD* w osoczu wynosiła 96,82%. Wartość diagnostyczna oznaczania genu *SRY* była niższa i wynosiła 87,50%. Testem mini SGM udało się znaleźć marker różnicujący w 77% przypadków.

Wnioski: Opracowany algorytm badania DNA płodowego metodami biologii molekularnej ma wysoką wartość diagnostyczną przy wykrywaniu genu *RHD* w osoczu i potwierdzaniu obecności DNA płodowego oraz umożliwia weryfikację wyników ujemnych, pod warunkiem zastosowania właściwych badań kontrolnych.

Słowa kluczowe: **płodowy DNA / gen RHD / konflikt serologiczny /
prenatalna diagnostyka nieinwazyjna /**

Adres do korespondencji:

Agnieszka Sapa
Katedra Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
ul. Borowska 211a, 50-556 Wrocław, Polska
Tel. 71 784 0624, Fax. 71 784 0054
e-mail: agnieszka.sapa@umed.wroc.pl

Otrzymano: 15.10.2013
Zaakceptowano do druku: 02.03.2014

Agnieszka Sapa et al. Diagnostyczna przydatność detekcji genu RHD w osoczu ciężarnych w profilaktyce konfliktu matczyno- płodowego...

Abstract

Objectives: The aim of the study was analytical validation of prenatal noninvasive fetal RHD detection in maternal plasma and the preliminary assessment of its clinical utility. Introduction of this noninvasive test into routine diagnostic use is important for more rational and safe immunoprophylaxis.

Material and methods: RHD gene was detected using real-time PCR. Primers and probes complementary to sequence on exons 7 and 10 were chosen. Samples with RHD-negative results were examined with additional tests to confirm the proper isolation of cell-free fetal DNA (cffDNA). For male fetuses, the presence of fetal DNA was confirmed by detection of the male genetic marker (SRY gene) using Quantifiler Duo® kit. In the case of SRY-negative result we used mini SGM test, which is based on the detection of short-tandem repeat polymorphism differences between maternal and fetal DNA.

Results: Diagnostic accuracy of RHD test was 96.82%, while diagnostic value of SRY determination was lower (87.50%). Mini SGM test was able to confirm the presence of fetal DNA in 77% of the cases.

Conclusions: Effectiveness of the proposed procedure of prenatal noninvasive RHD determination and cffDNA confirmation is high, on condition proper control samples and suitable verifying tests are used.

Key words: **cell-free fetal DNA / RHD gene / feto-maternal incompatibility / prenatal noninvasive diagnosis /**

Wstęp

Choroba hemolityczna płodu/norodka (ChHPN), wywołana niezgodnością na tle silnie immunogennego antygeny D z układu Rh, była przyczyną ponad połowy zgonów noworodków przed wprowadzeniem immunoprofilaktyki. Aktualnie immunizacja do antygeny RhD dotyczy 0,1-0,3% kobiet w krajach stosujących rutynową profilaktykę śródciążową i poporodową oraz 1,5-2%, czyli niemal dziesięciokrotnie więcej, w krajach, które stosują profilaktykę wyłącznie po porodzie [1, 2].

Immunoglobulina anti-D jako preparat krwiopochodny nie jest w pełni bezpieczna, pomimo skrupulatnie prowadzonych badań wirusologicznych. Obecnie ryzyko przeniesienia wirusów osłonkowych, w tym HBV, HCV i HIV jest znikome, natomiast istnieje prawdopodobieństwo przeniesienia wirusów bezosłonkowych (np. parwowirusa B19), białek prionowych, a także czynników infekcyjnych nie poznanych dotychczas. Ponadto immunoglobulina anti-D może doprowadzić do uczulenia na antygeny białkowe i wywołać reakcję anafilaktyczną [3-6].

W Polsce stosuje się obecnie głównie profilaktykę po porodzie, która jest objęta programem ministerialnym. Istnieją jednak wskazania do podania preparatu immunoglobuliny w czasie ciąży, w sytuacjach, kiedy mogło dojść do krwawienia płodowo-matczynego [4,7,8]. Profilaktykę śródciążową stosuje się, aby zminimalizować ryzyko immunizacji i w związku z tym zmniejszyć koszty ponoszone na opiekę i leczenie. W kilku krajach świata wykazano, że najbardziej uzasadnione z punktu widzenia ekonomicznego jest stosowanie immunoprofilaktyki również w 28 tygodniu ciąży, optymalnie w połączeniu z prenatalnym nieinwazyjnym badaniem obecności genu RHD pochodzenia płodowego we krwi ciężarnej w celu wykluczenia płodów niezagrażonych ChHPN [1, 9-12].

DNA płodowy (ang. *cell-free fetal DNA* – cffDNA), odkryty w 1997 roku w surowicy ciężarnych przez Lo i wsp., stanowi ważne źródło materiału do badań nieinwazyjnych, nie tylko do badań wykrywających niezgodność antygenową między matką a płodem, ale znajduje obecnie coraz więcej potencjalnych zastosowań w nowoczesnej diagnostyce laboratoryjnej, dotyczącej

opieki nad kobietami ciężarnymi [13]. Należy jednak pamiętać, że jest on w znacznym stopniu zdegradowany i trudny do izolacji. Pomimo że od odkrycia cffDNA we krwi matki upłynęło wiele lat, nadal ostatecznie nie opracowano standardów przygotowania materiału do badań i sposobu weryfikacji wyników ujemnych, co jest niezwykle ważne z punktu widzenia wiarygodności i harmonizacji badań laboratoryjnych [14-17].

Badania nieinwazyjne genu RHD nie są w Polsce popularne, choć mogą przynieść wiele korzyści. W przypadku istnienia wskazań do podania immunoglobuliny anti-D śródciążowo, lek mógłby być podany wyłącznie matkom dzieci RhD-dodatnich, szczególnie, że u ok. 38% ciężarnych płód jest RhD-ujemny. Z drugiej strony dają one szansę na odstąpienie od badań inwazyjnych, w sytuacji kiedy u matki noszącej płód RhD-ujemny są obecne przeciwciała [18].

Cel pracy

Celem pracy była walidacja analityczna testu do wykrywania genu RHD pochodzenia płodowego u ciężarnych RhD-ujemnych. Podjęto również próbę opracowania optymalnego algorytmu badania umożliwiającego wiarygodną weryfikację wyników ujemnych i wstępnie oceniono jego użyteczność kliniczną.

Materiały i metody

Materiałem do badań była krew pełna pobrana w objętości 4,9 ml na EDTA-K₂ z żelem od 63 pacjentek II Katedry i Kliniki Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, a ponadto od zdrowych ochotników RhD-dodatnich (4 kobiety nieciężarne i 2 mężczyźni) oraz RhD-ujemnych (3 kobiety nieciężarne i 2 mężczyźni). Równocześnie z próbkami krwi pełnej, od pacjentek z grupy badanej pobrano także wymazy policzkowe przy pomocy jałowych wymazówek z dakronową główką (Medical Wire & Equipment). Były one pobierane na czczo, przed umyciem zębów. Od wszystkich pacjentek uzyskano świadomą zgodę na pobranie materiału do badań. Przed rozpoczęciem badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Akademii Medycznej we Wrocławiu nr KB-504/2008 na ich przeprowadzenie.

Agnieszka Sapa et al. Diagnostyczna przydatność detekcji genu *RHD* w osoczu ciężarnych w profilaktyce konfliktu matczyno- płodowego...

Materiał był pobrany od pacjentek w wieku 18-42 lat (mediana 30 lat), między 14 a 41 tygodniem ciąży (mediana 36 hbd). W grupie badanej było 27 pierworódek i 36 wieloródek. Cięża fizjologiczne stanowiły 30,2%, natomiast cięża z różnymi powikłaniami 69,8%.

Próbki krwi pełnej były transportowane w temperaturze 2-8°C, następnie wirowane przez 10 minut, 2500 x g, w temperaturze 4°C. Oddzielone osocze wirowano ponownie przez 10 minut, 16000 x g, w temperaturze 4°C. Supernatant zamrażano w temperaturze poniżej -20°C w ciągu dwóch godzin od momentu pobrania krwi i w tych warunkach przechowywano do momentu izolacji DNA.

Wymazówki po pobraniu wymazów policzkowych suszono przez 2 h w komorze z laminarnym przepływem powietrza. Następnie zamykano i przechowywano w temperaturze 18-25°C do czasu izolacji DNA.

Izolacja DNA z osocza

Izolację prowadzono przy pomocy zestawu QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen), według instrukcji producenta. W celu zwiększenia wydajności izolacji, wprowadzono modyfikację polegającą na zwiększeniu objętości osocza do 400 µl. Przy użyciu spektrofotometru NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) oznaczano stężenie DNA i oceniano jego czystość. Próbki z materiałem genetycznym przechowywano w temperaturze -20°C do momentu przeprowadzenia dalszej analizy.

Izolacja DNA z wymazów policzkowych

Izolację w wymazów policzkowych wykonywano również przy użyciu zestawu QIAamp® DNA Mini Kit.

Oznaczanie genu *RHD*

W oznaczaniu genu *RHD* wykorzystano zestawy sond typu TaqMan i starterów komplementarnych do dwóch odcinków genu *RHD* – w obrębie eksonów 7 oraz 10 (Applied Biosystems, obecnie Life Technologies). Do kontroli przebiegu reakcji, jako „housekeeping gene”, wybrano gen β-globiny (*GLO*). W tabeli I przedstawiono ich sekwencje. W procedurze amplifikacji techniką real-time PCR zastosowano Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, obecnie Life Technologies). Technikę real-time PCR wybrano z uwagi na planowane przeprowadzenie badań ilościowych.

Real-Time PCR – Quantifiler® Duo

W próbkach, w których uzyskano wyniki ujemne pod względem genu *RHD* wykonano badania potwierdzające obecność płodowego DNA w wyizolowanym z osocza preparacie kwasów nukleinowych.

W przypadku mieszaniny w znacznym stopniu zdegradowanego DNA i o dużym nadmiarze DNA żeńskiego zastosowano Quantifiler® Duo Quantification Kit (Applied Biosystems, obecnie Life Technologies). Test ten posłużył do pomiaru stężenia DNA całkowitego (w oparciu o gen kodujący składnik H1 rybonukleazy P – *RPPH1*) oraz do pomiaru stężenia DNA płodowego w oparciu o męski marker płci – gen *SRY* (ang. *sex-determining region Y*).

Obydwa testy przeprowadzono na aparacie 7900 HT Fast Real-Time PCR System firmy Applied Biosystems (obecnie Life Technologies), wraz z oprogramowaniem SDS 2.2.2.

Badanie polimorfizmów typu STR (test mini SGM)

Dodatkową kontrolę obecności DNA płodowego w próbkach ujemnych dla genu *RHD* w osoczu kobiet ciężarnych stanowił nowatorsko wykorzystany multipleksowy test mini SGM. Test ten, mający zastosowanie do wykrywania polimorfizmów typu STR (ang. *short tandem repeat*), został opracowany w Zakładzie Techniki Molekularnych Katedry Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu do badania materiału dowodowego, zdegradowanego i zanieczyszczonego [24, 25]. Produkty reakcji multipleksowej amplifikacji z wykorzystaniem znakowanych fluorescencyjnie starterów poddawano rozdzielności techniką elektroforezy kapilarnej, przy użyciu aparatu 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, obecnie Life Technologies). Do analizy użyto oprogramowania GeneMapper® ID v.3.2. Test mini SGM obejmuje pięć markerów STR, pochodzących z sekwencji niekodujących genomu oraz dodatkowo gen amelogeniny, jako marker płci. Wykorzystane markery to mikrosatelity z jednostką repetytywną złożoną z 4 nukleotydów.

Badanie polimorfizmów wykonywano w próbkach DNA izolowanego z krwi matki, stanowiących mieszaninę matka-płód oraz w odpowiadających im próbkach DNA izolowanego z wymazów policzkowych, reprezentatywnych dla matki, w celu znalezienia różnicujących polimorfizmów.

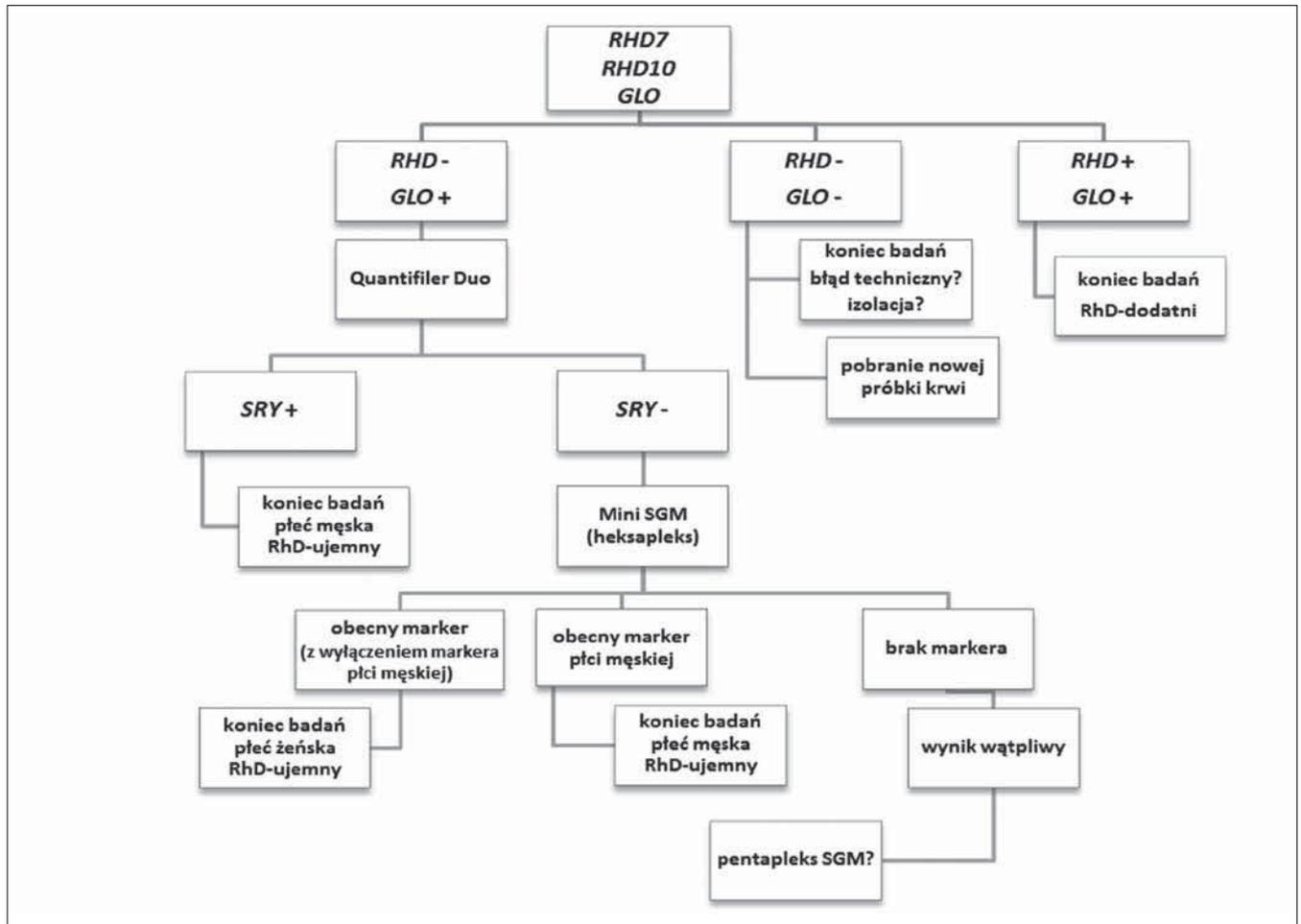
Wyniki

Aby sprawdzić specyficzność metody wykonano oznaczenia genu *RHD* z użyciem preparatów DNA wyizolowanego z próbek pobranych od zdrowych ochotników RhD-dodatnich oraz RhD-ujemnych, kobiet i mężczyzn. We wszystkich próbkach wyniki oznaczenia genu *RHD* i *SRY* były zgodne z fenotypem RhD i płcią.

W grupie badanej uzyskano 52,4% wyników dodatnich oraz 47,6% wyników ujemnych na obecność genu *RHD*. Wszystkie próbki były dodatnie pod względem genu kontrolnego β-globiny (*GLO*), przy czym w 2 próbkach ujemnych dla *RHD* równoczesny odczyt *GLO* wskazywał na bardzo małą zawartość DNA. Z powodu stosunkowo dużego rozrzutu między trzema powtórzeniami wykonanymi dla każdej próbki wyniki oznaczenia genu *RHD* potraktowano w sposób jakościowy.

W celu weryfikacji uzyskanych w czasie ciąży wyników oznaczenia genu *RHD* dokonano porównania z wynikami badań grupy krwi dziecka, przeprowadzanymi w Akademickim Centrum Diagnostyki Laboratoryjnej Akademickiego Szpitala Klinicznego przy ul. Borowskiej 213 we Wrocławiu. W przypadku ciąż mnogich wynik rozpatrywano jako dodatni, jeśli przynajmniej jeden z noworodków był RhD-dodatni.

Do wykonania testu Quantifiler® Duo zakwalifikowano próbki DNA, w których nie wykryto genu *RHD*. Badanie wykonano w celu potwierdzenia obecności w próbce cfDNA i weryfikacji ewentualnych fałszywie ujemnych wyników oznaczenia *RHD*. W związku z dużym brakiem precyzji określonym przez wewnętrzny współczynnik zmienności równy 66,7% w badanym przedziale stężeń oraz uzyskanymi niskimi stężeniami DNA, wyniki testu Quantifiler® Duo w próbkach badanych zostały potraktowane w sposób jakościowy. Dla wszystkich próbek badanych uzyskano wyniki dodatnie dla markera obecności DNA ludzkiego. Wynik dodatni dla męskiego genu *SRY* uzyskano w 13 spośród 32 badanych próbek (40,62%). Wyniki badań testem Quantifiler® Duo w próbkach badanych skonfrontowano z płcią

Figure 1. Opracowany algorytm oznaczania genu RHD w osoczu ciężarnej wraz z badaniami potwierdzającymi i propozycjami postępowania w przypadkach wątpliwych.**Tabela 1.** Zastosowane w badaniach startery (ang. *primer*) i sondy typu TaqMan®.

	5'Primer3' F (forward)	5'Primer3' R (reverse)	5'Sonda TaqMan® 3'
RHD ekson 7 [19, 20]	CTCCATCATGGGCTACAA	CCGGCTCCGACGGTATC	FAM-AGCAGCACAAATGTAGATGATCTCTCCA-TAMRA
RHD ekson 10 [19, 21]	CCTCTCACTGTTGCCTGCATT	AGTGCCTGCGCGAACATT	FAM-TACGTGAGAAACGCTCATGACAGCAAAGCTT-TAMRA
Gen β-globiny GLO [19, 22, 23]	GTGCACCTGACTCCTGAGGAG	CCTTGATACCAACCTGCCAG	FAM-AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGG-VIC

dziecka, stwierdzoną po urodzeniu. W przypadku ciąży mnogich wynik interpretowano jako prawdziwie dodatni, jeśli przynajmniej jeden noworodek był płci męskiej. W badaniu obecności genu *SRY* uzyskano 4 wyniki fałszywie ujemne. Próbkę te zostały pobrane od pacjentek w 28, 29, 33 i 35 tygodniu ciąży i nie było możliwości pobrania materiału po raz kolejny. W tabeli II (a i b) przedstawiono uzyskane wyniki w grupie badanej w odniesieniu do stanu faktycznego stwierdzonego po porodzie, natomiast w tabeli III obliczone podstawowe parametry opisujące wiarygodność diagnostyczną obu ocenianych testów.

Badanie polimorfizmów typu STR testem mini SGM wykonano u 19 pacjentek, u których oznaczenia genów *RHD* i *SRY* dały wyniki ujemne. W badaniu porównywano profil genetyczny

ciężarnej uzyskany z wymazu policzkowego z mieszaniną DNA matki i płodu obecną w osoczu. Testem mini SGM przeanalizowano 38 próbek (19 par). Jako pierwszy opracowywano profil matki, a następnie analizowano mieszaninę obecną w osoczu pod kątem obecności alleli różnicujących. W toku analizy produktów amplifikacji mieszaniny DNA występującej w osoczu, w 12 próbkach wykryto jeden marker różnicujący, w 1 próbce znaleziono trzy allele, natomiast w 2 próbkach cztery allele różnicujące matkę i płód. W 4 próbkach nie udało się znaleźć *locus* różnicującego tą wersję testu. W dwóch próbkach, dla których nie wykryto genu *SRY* testem Quantifiler® Duo, w badaniu testem mini SGM był obecny męski allel markera płci, co umożliwiło weryfikację dwóch wyników fałszywie ujemnych.

Agnieszka Sapa et al. Diagnostyczna przydatność detekcji genu *RHD* w osoczu ciężarnych w profilaktyce konfliktu matczyno- płodowego...

Całkowita dokładność diagnostyczna przedstawionego algorytmu postępowania wynosiła zatem 96,82%.

Dyskusja

W celu ustalenia wartości diagnostycznej badania laboratoryjnego warunkiem koniecznym, choć niewystarczającym, jest szczegółowe poznanie cech analitycznych testu, ocenianych w toku walidacji metody. Kolejnym, kluczowym etapem jest ocena kliniczna. W niniejszej pracy podjęto się oceny testu w grupie pacjentek RhD-ujemnych o zróżnicowanych cechach klinicznych, w tym również ciąży o fizjologicznym przebiegu, bez wstępnej selekcji pacjentek, która była stosowana przez niektórych badaczy [18, 26, 27].

Punktem wyjścia i zarazem newralgicznym etapem wykonywania badań na DNA jest jego izolacja z próbki badanej. cffDNA ulega szybkiej degradacji i stanowi jedynie niewielką frakcję całkowitego rozpuszczonego DNA, z dużym „tłem” DNA matczynego. W niniejszej pracy zastosowano warunki wstępnego opracowania materiału zalecane przez Chiu i wsp., oraz zestaw do izolacji DNA QIAamp DNA Blood Mini Kit, jeden z najczęściej wybieranych przez badaczy [14, 19, 26, 28-36].

Do oznaczania *RHD* wybrano startery i sondy komplementarne do eksonu 10 i 7, opisane przez Lo i wsp. oraz Leglera i wsp., a wykorzystane do badania także przez Hromadniková i wsp. [19-23]. Przy założonym w przedstawionej pracy sposobie interpretacji wyników uzyskano dokładność diagnostyczną testu wynoszącą 96,82%. Inni badacze wykorzystujący ten sam zestaw markerów uzyskali wyższą dokładność testu (od 99,5 do 100%), ale stosowali inne protokoły izolacji DNA i/lub wykonywali większą liczbę powtórzeń (nawet do 7 dla każdego markera) [19,23]. Obecne w wielu pracach wyniki fałszywie dodatnie, których nie stwierdzono w tym badaniu, nie zawsze były związane z nietypowymi odmianami alleli układu Rh [9, 30]. W niektórych pracach w przypadku uzyskania wątpliwych wyników pobierano materiał od pacjentki po raz kolejny [18, 27, 38] lub wyłączano takie przypadki z grupy badanej, wnioskując o braku płodowego DNA w próbce [41]. Zgodnie z zaleceniami STARD (Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy) całkowita dokładność diagnostyczna testu powinna jednak zostać obliczona również po uwzględnieniu wyników wykluczonych, niezależnie od przyczyny [39, 42]. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki oznaczenia genu *RHD* nie odbiegają od wyników metaanalizy przeprowadzonej przez Geifman-Holtzman i wsp., którzy obliczyli dokładność diagnostyczną łącznie dla wszystkich metod i protokołów badania w osoczu opisanych w dostępnym piśmiennictwie i uzyskali wartość na poziomie 96,5%, przy czym u pacjentek immunizowanych była ona niższa i wynosiła 91,8% [43].

Znalezienie uniwersalnego markera potwierdzającego obecność płodowego DNA jest największym wyzwaniem wszystkich metod diagnostyki prenatalnej wykorzystujących łatwo dostępny materiał, jakim jest krew matki. Odkrycie cffDNA przez Lo i wsp. było możliwe dzięki oznaczeniu w preparatach kwasów nukleinowych wyizolowanych z osocza kobiet ciężarnych męskiego markera płci. Badacze ci wykorzystali specyficzną sekwencję markerową *DYS14* z genu *TSPY* zlokalizowanego na chromosomie Y, z użyciem starterów umożliwiających amplifikację pojedynczej sekwencji i uzyskanie produktu o wielkości 198 pz [13]. W wielu kolejnych publikacjach do potwierdzania obecności DNA męskiego używano genu *SRY* (ang. *sex-determining*

Tabela II. Weryfikacja wyników uzyskanych dla genu *RHD* (a) i *SRY* (b) po urodzeniu dziecka.

a.

RhD po porodzie		Wynik w osoczu (obecność <i>RHD</i>)	
Dodatni	33	Prawdziwie dodatni	31
		Fałszywie ujemny	2
Ujemny	30	Prawdziwie ujemny	30
		Fałszywie dodatni	0

b.

Płeć dziecka	Liczba	Quantifiler® Duo – <i>SRY</i> dodatni	Quantifiler® Duo – <i>SRY</i> ujemny
Męska	17	13	4
Żeńska	15	0	15
W sumie	32	13	19

Tabela III. Parametry opisujące wartość diagnostyczną testu w kierunku obecności genu *RHD* i *SRY* w osoczu ciężarnych.

Parametr	<i>RHD</i>	<i>SRY</i>
	Wartość [%]	
Czułość diagnostyczna	93,94	76,47
Swoistość diagnostyczna	100	100
Wartość predykcyjna wyniku dodatniego	100	100
Wartość predykcyjna wyniku ujemnego	93,75	78,95
Dokładność diagnostyczna testu	96,82	87,50

region Y), który zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu Y i koduje białko TDF (czynnik determinujący jądro, ang. *testis determining factor*) [18, 19, 27-32, 34]. W niniejszej pracy do potwierdzenia obecności markera męskiego pochodzenia płodowego zastosowano komercyjny test Quantifiler® Duo Quantification Kit (Applied Biosystems obecnie Life Technologies). Według danych producenta test ma zastosowanie również do badania mieszanin DNA i umożliwia oznaczenie stężenia markera męskiego w obecności 1000-krotnego nadmiaru DNA żeńskiego. Oznaczanie genu *SRY* w przedstawionej pracy miało jednak niską wartość diagnostyczną, ponieważ uzyskano duży odsetek wyników fałszywie ujemnych. Czułość testu wyniosła 76,47% i w związku z tym całkowita wartość diagnostyczna była na poziomie 87,50%. Istnieją podobne doniesienia o słabej przydatności genu *SRY* przy badaniu DNA płodowego, który stosunkowo często generuje wyniki fałszywie ujemne [26, 34]. Nie udało się również w sposób wiarygodny oznaczyć stężenia DNA męskiego w próbkach, z powodu dużego błędu precyzji metody, wyrażonego współczynnikiem zmienności równym 66,70%. Wynika to najprawdopodobniej z bardzo niskiego stężenia DNA w uzyskanych preparatach oraz jest związane z dużym stopniem jego degradacji. Podobne obserwacje dotyczące genu *SRY* i jego

Agnieszka Sapa et al. Diagnostyczna przydatność detekcji genu *RHD* w osoczu ciężarnych w profilaktyce konfliktu matczyno- płodowego...

przydatności do oznaczania stężenia płodowego DNA opisali Zimmermann i wsp. [44], którzy uzyskali wysoki błąd precyzji dla oznaczenia tego genu, wyrażony współczynnikiem zmienności od 26 do 140%. Pomimo stosunkowo niskiej czułości diagnostycznej uzyskanej w niniejszej pracy w większości przypadków ujemnych wyników dla genu *RHD* udało się potwierdzić obecność cfDNA tym testem, natomiast wyniki ujemne dla *SRY* były weryfikowane dodatkowym badaniem.

W próbkach, w których badania obecności genów *RHD* i *SRY* dawały wyniki ujemne, wykonywano oznaczanie polimorfizmów typu mikrosatelitarnego, przy użyciu testu mini SGM. Test został wybrany z uwagi na jego udokumentowaną przydatność w przypadku badania DNA uzyskanego z materiału dowodowego ze śladów biologicznych, który podobnie jak DNA płodowy jest w znacznym stopniu zdegradowany i reprezentowany przez krótkie odcinki [24, 25, 45]. Podczas wykonywania testu założono, że allele oznaczone w preparatach z osocza i jednocześnie nieobecne w profilu genetycznym matki, przygotowanym w oparciu o DNA z wymazu policzkowego, są pochodzenia płodowego. Wyniki te nie były weryfikowane poprzez porównanie z DNA ojca dziecka. Badania zaprojektowano w taki sposób, aby uniknąć rozbieżności związanych z domniemaniem ojcostwa. Zastosowany w teście mini SGM marker płci okazał się istotnym składnikiem heksapleksu, ponieważ dzięki niemu udało się zweryfikować 2 wyniki fałszywie ujemne uzyskane testem Quantifiler® Duo. Spośród czterech próbek, w których nie znaleziono allelu różnicującego dla żadnego z oznaczanych markerów, w dwóch przypadkach urodziły się RhD-ujemne dziewczynki, natomiast w dwóch byli to RhD-dodatni chłopcy.

Podobne wnioski wypływają z wyników badań prowadzonych przez Birch i wsp. [31], którzy wskazują na wysoką wartość diagnostyczną markera płci włączonego do zestawu AmpFISTR SGM Plus (99%), ale niżej oceniają oni przydatność pozostałych markerów. Należy jednak zaznaczyć, że badacze ci posługiwali się pełną wersją testu identyfikacyjnego (łącznie 11 markerów), w którym obecne markery ukierunkowane są na dłuższe odcinki analizowanego materiału genetycznego. Do kontroli oznaczeń wykorzystywano również AmpFISTR Y-filer, który w oparciu wyłącznie o marker płci męskiej (17 *Y-STR loci*) pozwolił na uzyskanie 100% czułości i swoistości diagnostycznej [33]. W wielu pracach DNA do badań porównawczych był izolowany z kożuszka leukocytarno-płodowego, co może jednak utrudniać interpretację wyników, z powodu obecności w próbce płodowych komórek jądrzastych [18, 21, 27, 32, 46, 47]. Wartość diagnostyczna innych sposobów potwierdzania obecności płodowego DNA w próbce również jest dyskusyjna i wynosi od ok. 60 do nawet 100% dla testów opartych na oznaczaniu polimorfizmów typu SNP, IDP czy poprzez wykorzystanie hipermetylacji promotora genu *RASSF1A* [18, 26, 32, 34, 36, 47]. W dalszym ciągu jednak nie opracowano markera niezależnego od płci, którego oznaczenie mogłoby zostać wykonane w teście multipleksowym wraz z oznaczeniem genu *RHD*.

W dwóch przypadkach dotyczących noworodków RhD-dodatnich płci męskiej zastosowany algorytm badania nie doprowadził do uzyskania poprawnych wyników. Dokładna analiza wyników uzyskiwanych na kolejnych etapach badania umożliwiła wyciągnięcie wniosku, że najbardziej prawdopodobną przyczyną niskiej zawartości DNA w próbce była jego wadliwa izolacja z osocza lub niewłaściwe warunki transportu i wstępnego opar-

cowania materiału. W przypadku takiego obrazu wyników właściwym postępowaniem rozstrzygającym powinno być ponowne pobranie krwi od pacjentek oraz izolacja DNA ze świeżego osocza.

W pozostałych dwóch przypadkach, w których nie znaleziono markerów różnicujących, wyniki oznaczeń nie nasuwały wątpliwości związanych z obecnością w próbce zbyt niskiego stężenia DNA. W obu przypadkach urodziły się RhD-ujemne dziewczynki. Takie próbki w celu rozstrzygnięcia powinny być kwalifikowane do wykonania drugiej części testu mini SGM (pentapleksu), gdzie porównywanych jest 5 pozostałych markerów wchodzących w skład pełnej wersji testu. Wartość diagnostyczna takiego postępowania wymaga jednak oceny na materiale izolowanym z osocza.

Algorytm postępowania wraz z propozycjami postępowania w przypadkach uzyskania wyników wątpliwych został przedstawiony na rysunku 1. Miał on bardzo wysoką skuteczność w wykrywaniu genu *RHD* w osoczu ciężarnych. Zastosowanie opracowanego schematu kontroli umożliwia weryfikację wyników ujemnych i pomimo niższej czułości diagnostycznej stanowi niewątpliwą korzyść dla matek RhD-ujemnych. Dalsze doskonalenie procesu izolacji DNA płodowego oraz dopracowanie sposobu kontroli m.in. przez ocenę testu pentapleksu mini SGM dodatkowo podniesie wartość diagnostyczną badania.

Badania prenatalne wykorzystujące cfDNA to narzędzie diagnostyczne o ogromnym potencjale, jeszcze nie w pełni wykorzystane. W patologii ciąży stwierdzono zmiany dotyczące stężenia płodowego DNA m.in. w stanie przedzręczym, ciąży ektopowej oraz po operacyjnym zakończeniu ciąży w pierwszym trymestrze (jako czuły marker krwawienia płodowo-matczynego) [48-51]. Szczególnie istotna wydaje się możliwość wykorzystania badań na cfDNA w połączeniu z najbardziej nowoczesnymi technikami badawczymi w diagnostyce prenatalnej chorób genetycznych. Trwają badania nad wartością diagnostyczną testów tego rodzaju w diagnostyce aneuploidii, m.in. zespołu Downa oraz zespołu Edwardsa, a ponadto w wielu chorobach dziedziczonych jednogennie (choroba Huntingtona, achondroplazja, dystrofia mięśniowa, hemofilia) [52-59]. Opracowanie szerokiego panelu nieinwazyjnych badań prenatalnych wytycza zatem nowe cele i perspektywy diagnostyki laboratoryjnej, natomiast dostęp do oznaczania genu *RHD* dla pacjentek RhD-ujemnych powinien w niedalekiej przyszłości stać się standardem w dużych specjalistycznych ośrodkach klinicznych.

Wnioski

1. Opracowany test do wykrywania płodowego genu *RHD* ma wysoką dokładność diagnostyczną i umożliwia uzyskanie poprawnych wyników, pod warunkiem zastosowania kontroli wewnętrznej (*GLO*).
2. Opracowany i zaproponowany algorytm ma wysoką wartość diagnostyczną i umożliwia weryfikację wyników ujemnych dla genu *RHD*.

Oświadczenie autorów

1. Agnieszka Sapa – autor koncepcji i założeń pracy, opracowanie metod badawczych, wykonanie badań laboratoryjnych, analiza i interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu i piśmiennictwa – autor zgłaszający i odpowiedzialny za manuskrypt.

Agnieszka Sapa et al. Diagnostyczna przydatność detekcji genu RHD w osoczu ciężarnych w profilaktyce konfliktu matczyno-rodowodowego...

2. Anna Jonkisz – wykonanie badań laboratoryjnych, analiza wyników, opracowanie wyników badań, współautor tekstu pracy.
3. Mariusz Zimmer – zebranie materiału, współautor protokołu, korekta i aktualizacja literatury, korekta manuskryptu, przechowywanie dokumentacji.
4. Artur Klósek – zebranie materiału, współautor założeń pracy, analiza i interpretacja wyników, korekta manuskryptu.
5. Mieczysław Woźniak – uzyskanie funduszy na realizację badań laboratoryjnych, współautor koncepcji i założeń badań, ostateczna weryfikacja i akceptacja manuskryptu.

Źródło finansowania: projekt finansowany z grantu KBN nr: N N407 050936.

Konflikt interesów: Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów oraz nie otrzymali żadnego wynagrodzenia związanego z powstawaniem pracy.

Piśmiennictwo

1. Liunbruno GM, D'Alessandro A, Rea F, [et al.]. The role of antenatal immunoprophylaxis in the prevention of maternal-foetal anti-Rh(D) alloimmunisation. *Blood Transfus.* 2010, 8, 8-16.
2. Koelewijn JM, de Haas M, Vrijotte TGM, [et al.]. Risk factors for RhD immunisation despite antenatal and postnatal anti-D prophylaxis. *BJOG.* 2009, 116, 1307-1314.
3. Avent ND, Reid ME: The Rh blood group system: a review. *Blood.* 2000, 95, 375-387.
4. Michalewska B, Seyfried H, Kuśnierz-Alejska G, Łętowska M. Immunologia transfuzjologiczna krwinek czerwonych. Obowiązujący zakres badań wykonywanych u kwiadawców, chorych i kobiet ciężarnych. *J Transfus Med.* 2009, 2, 175-242.
5. Brinc D, Lazarus AH. Mechanism of anti-D action in the prevention of hemolytic disease of the fetus and newborn. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* 2009, 185-191.
6. Brinc D, Denomme GA, Lazarus AH. Mechanism of anti-D action in the prevention of hemolytic disease of the fetus and newborn: what can we learn from rodent models? *Curr Opin Hematol.* 2009, 16, 488-496.
7. Flegel WA: Molecular genetics and clinical applications for RH. *Transfus Apher Sci.* 2011, 44, 81-91.
8. Seyfried H: Immunoprofilaktyka konfliktu RhD. W: Immunologia krwinek czerwonych. Niedokrwistości immunohemolityczne. Wyd. I. Red. Fabjańska-Mitek J. Warszawa: Oinpharma, 2008, 106-118.
9. Finning K, Martin P, Summers J, [et al.]. Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *BMJ.* 2008, 336, 816-818.
10. Pilgrim H, Lloyd-Jones M, Rees A. Routine antenatal anti-D prophylaxis for RhD-negative women: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 2009, 13 (10).
11. Daniels G, Finning K, Martin P, Summers J. Fetal RHD genotyping: a more efficient use of anti-D immunoglobulin. *Transfus Clin Biol.* 2007, 14, 568-571.
12. Illanes S, Soothil P. Management of red cell alloimmunisation in pregnancy: the non-invasive monitoring of the disease. *Prenat Diagn.* 2010, 30, 668-673.
13. Lo Y, Corbetta N, Chamberlain P, [et al.]. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997, 350, 485-487.
14. Legler TJ, Liu Z, Mavrou A, [et al.]. Workshop report on the extraction of foetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn.* 2007, 27, 824-829.
15. Chitty LS, van der Schoot CE, Hahn S, Avent ND. SAFE—the Special non-invasive Advances in Fetal and neonatal Evaluation network: aims and achievements. *Prenat Diagn.* 2008, 28, 83-88.
16. Lomas-Francis C, Reid ME. A summary of ISBT/ICSH international workshops and proficiency tests for molecular blood group genotyping. *Transfusion.* 2007, 47, 95-97.
17. Macher HC, Noguero P, Medrano-Campillo P, [et al.]. Standardization non-invasive fetal RHD and SRY determination into clinical routine using a new multiplex RT-PCR assay for fetal cell-free DNA in pregnant women plasma: Results in clinical benefits and cost saving. *Clin Chim Acta.* 2012, 413, 490-494.
18. Brojer E, Żupańska B, Guz K, [et al.]. Noninvasive determination of fetal RHD status by examination of cell-free DNA in maternal plasma. *Transfusion.* 2005, 45, 1473-1480.
19. Hromadnikova I, Vechetova L, Vesela K, [et al.]. Non-invasive fetal RHD and RhCE genotyping using real-time PCR testing of maternal plasma in RhD-negative pregnancies. *J Histochem Cytochem.* 2005, 53, 301-305.
20. Legler TJ, Lynen R, Maas JH, [et al.]. Prediction of fetal RhD and Rh CcEe phenotype from maternal plasma with real-time polymerase chain-reaction. *Transfus Apher Sci.* 2002, 27, 217-223.
21. Lo YMD, Hjeltn NM, Fidler C, [et al.]. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med.* 1998, 339, 1734-1738.
22. Lo YMD, Tein MSC, Lau TK, [et al.]. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet.* 1998, 62, 768-775.
23. Hromadnikova I, Houbova B, Hidelova D, [et al.]. Replicate real-time PCR testing of DNA in maternal plasma increases the sensitivity of non-invasive fetal sex determination. *Prenat Diagn.* 2003, 23, 235-238.
24. Żołędzewska M. Badanie polimorfizmu mikrosatelitarnego w próbkach częściowo zdegradowanego DNA z użyciem własnej metody reakcji multipleksowej PCR. Rozprawa doktorska, Akademia Medyczna we Wrocławiu, 2003.
25. Jonkisz A. Test mini STR dla śladów biologicznych. W: Bio-Forum VII: Środkowoeuropejskie Targi Biotechnologii i Biobiznesu. Łódź, 2008, 145.
26. Scheffer PG, van der Schoot CE, Page-Christiaens GCML, [et al.]. Reliability of fetal sex determining using maternal plasma. *Obstet Gynecol.* 2010, 115, 117-126.
27. Minon J-M, Gerard C, Senterre J-M, [et al.]. Routine fetal RHD genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium. *Transfusion.* 2008, 48, 373-381.
28. Chiu RWK, Poon LLM, Lau TK, [et al.]. Effects of blood-processing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal plasma. *Clin Chem.* 2001, 47, 1607-1613.
29. 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, 42, 1079-1085.
30. Randen I, Hauge R, Kjeldsen-Kragh J, Fagerhol MK: Prenatal genotyping of RHD and SRY using maternal blood. *Vox Sang.* 2003, 85, 300-306.
31. Birch L, English CA, O'Donoghue K, [et al.]. Accurate and robust quantification of circulating fetal and total DNA in maternal plasma from 5 to 41 weeks of gestation. *Clin Chem.* 2005, 51, 312-320.
32. Zhou L, Thorson JA, Nugent C, [et al.]. Noninvasive prenatal RHD genotyping by real-time polymerase chain reaction using plasma from D-negative pregnant women. *Am J Obstet Gynecol.* 2005, 193, 1966-1971.
33. Kimura M, Sato C, Hara M, [et al.]. Noninvasive fetal RHD genotyping by maternal plasma with capillary electrophoresis. *Transfusion.* 2008, 48, 1156-1163.
34. Chan KCA, Ding C, Gerovassili A, [et al.]. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: a universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. *Clin Chem.* 2006, 52, 2211-2218.
35. Pirelli KJ, Pietz BC, Johnson ST, [et al.]. Molecular determination of RHD zygosity: predicting risk of hemolytic disease of the fetus and newborn related to anti-D. *Prenat Diagn.* 2010, 30, 1207-1212.
36. Li Y, Kazzaz JA, Kellner LH, Brown SA. Incorporation of fetal DNA detection assay in a noninvasive RhD diagnostic test. *Prenat Diagn.* 2010, 30, 1010-1012.
37. Finning K, Martin P, Summers J, [et al.]. Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *BMJ.* 2008, 336, 816-818.
38. Clausen FB, Krog GR, Pieneck K, [et al.]. Evaluation of two real-time multiplex PCR screening assays detecting fetal RHD in plasma from RhD negative women to ascertain the requirement for antenatal RhD prophylaxis. *Fetal Diagn Ther.* 2011, 29, 155-163.
39. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, [et al.]. The STARD statement for reporting studies of diagnostic accuracy: explanation and elaboration. *Clin Chem.* 2003, 49, 7-18.
40. Randen I, Hauge R, Kjeldsen-Kragh J, Fagerhol MK. Prenatal genotyping of RHD and SRY using maternal blood. *Vox Sang.* 2003, 85, 300-306.
41. Gautier E, Benachi A, Giovannardi Y, [et al.]. Fetal RHD-genotyping by maternal serum analysis: a two year experience. *Am J Obstet Gynecol.* 2005, 192, 666-669.
42. Freeman K, Szczepura A, Osipenko L. Non-invasive fetal RHD genotyping tests: a systematic review of the quality of reporting of diagnostic accuracy in published studies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009, 142, 91-98.
43. Geifman-Holtzman O, Grotegut CA, Gaughan JP. Diagnostic accuracy of noninvasive fetal Rh genotyping from maternal blood – a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2006, 195, 1163-1173.
44. Zimmermann BG, Holzgreve W, Avent N, Hahn S. Optimized real-time quantitative PCR measurement of male fetal DNA in maternal plasma. *Ann N Y Acad Sci.* 2006, 1075, 347-349.
45. Butler JM, Shen Y, McCord BR. The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *J Forensic Sci.* 2003, 48, 1054-1064.
46. Grootkerk-Tax MGHM, Soussan AA, de Haas M, [et al.]. Evaluation of prenatal RHD typing strategies on cell-free fetal DNA from maternal plasma. *Transfusion.* 2006, 46, 2142-2148.
47. Dhallan R, Guo X, Emche S, [et al.]. A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA present in maternal blood: a preliminary study. *Lancet.* 2007, 369, 474-481.
48. Levine RJ, Qian C, LeShane ES, [et al.]. Two-stage elevation of cell-free fetal DNA in maternal sera before onset of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2004, 190, 707-713.
49. Lázár L, Nagy B, Bán Z, [et al.]. Presence of cell-free fetal DNA in plasma of women with ectopic pregnancies. *Clin Chem.* 2006, 52, 1599-1601.
50. Wataganara T, LeShane ES, Chen AY, [et al.]. Circulating cell-free fetal nucleic acid analysis may be a novel marker of fetomaternal hemorrhage after elective first-trimester termination of pregnancy. *Ann N Y Acad Sci.* 2004, 1022, 129-134.
51. Wataganara T, Chen AY, LeShane ES, [et al.]. Changes of cell-free fetal DNA in maternal plasma after elective termination of pregnancy. *Clin Chem.* 2005, 51, 217-219.
52. Chiu RWK, Cantor CR, Lo YMD. Non-invasive prenatal diagnosis by single molecule counting technologies. *Trends Genet.* 2009, 25, 324-331.
53. Lo YMD. Fetal nucleic acids in maternal plasma. Toward the development of noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidies. *Ann N Y Acad Sci.* 2008, 1137, 140-143.
54. Van Lith JMM, Benacerraf BR, Yagel S. Current controversies in prenatal diagnosis 2: Down syndrome screening: is ultrasound better than cell-free nucleic acids in maternal blood? *Prenat Diagn.* 2011, 31, 231-234.
55. Tsui DWY, Lam YMD, Lee WS, [et al.]. Systematic identification of placental epigenetic signatures for the noninvasive prenatal detection of Edwards syndrome. *PLoS One.* 2010, 5 (11), e15069.
56. Wright CF, Burton H. The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update.* 2009, 15, 139-151.
57. Avent ND, Madgett TE, Maddocks DG, Soothill PW. Cell-free fetal DNA in the maternal serum and plasma: current and evolving applications. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2009, 21, 175-179.
58. Tsui NBY, Kadir RA, Chan KCA, [et al.]. Noninvasive prenatal diagnosis of hemophilia by microfluidics digital analysis of maternal plasma DNA. *Blood.* 2011, 117, 3684-3691.
59. Gorzelnik K, Bijok J, Zimowski JG, [et al.]. Nieinwazyjna diagnostyka prenatalna trisomii 21, 18 i 13 z wykorzystaniem wolnego pozakomórkowego DNA płodu. *Ginekol Pol.* 2013, 84, 714-719.