

Nieinwazyjne badania prenatalne z osocza kobiet ciężarnych w konfliktach serologicznych w Polsce

Noninvasive prenatal diagnosis from maternal plasma in serological conflicts in Poland: current practice and future prospects

Orzińska Agnieszka, Guz Katarzyna, Brojer Ewa

Zakład immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej
Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

Streszczenie

W pracy przedstawiono zasadę i wyniki badań nieinwazyjnych w konfliktach serologicznych. Dzięki nieinwazyjnej diagnostyce identyfikuje się ciężarne noszące płody bez antygeny, do którego skierowane są przeciwciała czyli takie, którym nie zagraża choroba hemolityczna.

*Obecnie w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii (IHIT) rutynowo bada się RHD, RHCE*c i RHCE*E płodu.*

W trakcie opracowania jest genotypowanie antygeny K.

Słowa kluczowe: **diagnostyka prenatalna / choroba hemolityczna noworodków /
/ techniki genetyczne / układ Rh grupy krwi /
/ układ KELL grupy krwi /**

Abstract

The principles and results of noninvasive prenatal diagnosis in serological conflicts in Poland were described in the following work. Noninvasive fetal genotyping from plasma of immunized mother identifies women carrying fetus without incompatible antigen and risk of hemolytic disease.

*The presence of fetal RHD gene or RHCE*c/E alleles in maternal plasma is examined routinely in Institute of Hematology and Blood Transfusion in Warsaw.*

*Preliminary results of successful fetal KEL*1 genotyping from maternal blood were obtained.*

Key words: **prenatal diagnosis / hemolytic disease of newborn /
/ genetic techniques / Rh-Hr Blood-Group System /
/ Kell Blood-Group System /**

Adres do korespondencji:

Agnieszka Orzińska
Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej
Instytut Hematologii i Transfuzjologii,
00-975 Warszawa, ul. Chocimska 5
e-mail: orzinska@ihit.waw.pl
kguz@ihit.waw.pl
ebrojer@ihit.waw.pl

Otrzymano: 01.07.2009
Zaakceptowano do druku: 10.09.2009

Znaczenie określenia antygenów płodu w ciąży zagrożonej konfliktem serologicznym

Allopreciwiacials anty-D, anty-c i rzadziej anty-E z układu Rh u kobiet ciężarnych mogą być przyczyną choroby hemolitycznej płodów/novorodków (ChHP/N). Skuteczność profilaktyki poporodowej w zapobieganiu immunizacji najgroźniejszym z nich - antygenem D - wynosi około 90%. U 1% RhD ujemnych kobiet dochodzi do zimmunizowania w trakcie ciąży, zwłaszcza w jej ostatnim trymestrze. Podanie w 28 lub 34 tygodniu ciąży immunoglobuliny anty-D, stosowane obecnie rutynowo w wielu krajach, obniża skutecznie tę liczbę do 0,2% [1].

Ważnym elementem diagnostyki konfliktów serologicznych, umożliwiającym zawężenie grupy kobiet wymagających ścisłego monitorowania i ewentualnego leczenia, jest ustalenie, czy u płodu występuje antygen, do którego skierowane są przeciwciała wykryte u matki. W najczęściej spotykanym konflikcie RhD, wiedza o statusie D płodu istotna jest też dla kobiet niezimmunizowanych. Gdy płód jest RhD ujemny, kobiecie nie trzeba podawać immunoglobuliny anty-RhD, co pozwala zaoszczędzić deficytowy preparat [2].

Dotychczas oznaczenie antygenów D, c lub E płodu było przeprowadzane metodami serologicznymi z erytrocytów pobranych podczas kordocentezy albo metodami genetycznymi z amniocytów lub kosmków łożyska. Zabiegi te niosą ze sobą ryzyko powikłań, pogłębienia immunizacji matki lub utraty ciąży [3, 4].

Najnowsze badania antygenów płodu, oparte na analizie DNA, można wykonywać z materiału pobranego od matki w sposób całkowicie nieinwazyjny dla płodu [5].

Badania nieinwazyjne antygenów płodu z osocza matki

Poszukiwania nieinwazyjnych metod badań prenatalnych rozpoczęto ponad pół wieku temu. Początkowo skupiono się nad komórkami krwi płodu, przenikającymi do krwiobiegu matki w trakcie ciąży lecz wykazano, że mogą one przetrwać w organizmie matki ponad 27 lat po porodzie [6, 7, 8]. Ten materiał nie może być więc używany do diagnostyki aktualnej ciąży.

W 1997 roku Lo i wsp. wykazali, że w osoczu kobiety ciężarnej obecne jest pozakomórkowe, wolnokrążące DNA płodu [9].

Stanowi 3 do 6% DNA izolowanego z osocza, jest wykrywalne już w 5-7 tygodniu ciąży, jego stężenie wzrasta w trakcie ciąży, ale szybko zanika po porodzie - wynik badania dotyczy zatem aktualnej ciąży [10, 11].

Przebieg nieinwazyjnego badania genotypu płodu z osocza matki

Badanie genów płodu przeprowadza się od połowy drugiego trymestru ciąży (wcześniej zbyt niskie stężenie DNA płodu w osoczu). Trzeba pobrać przynajmniej 10 ml krwi matki do jednorazowych probówek próżniowych z barierą żelową i z napyłonym EDTA, co eliminuje niebezpieczeństwo zanieczyszczenia próbki obcym DNA. (Tabela I).

W ciągu 5 godzin od pobrania należy odwirować osocze od elementów komórkowych stosując odpowiednie warunki wirowania, by nie zubożyć osocza w DNA płodu. Probówek nie należy otwierać i przesać w ciągu 24 godzin do Pracowni Biologii Molekularnej lub zamrozić i przekazać w stanie zamrożenia. Rozmrażanie i ponowne zamrażanie osocza powoduje szybką degradację płodowego DNA. (Tabela I).

Do izolowania DNA płodowego z osocza matki stosuje się metody automatyczne o dużej wydajności. (Tabela I).

W badaniu wykorzystuje się wysokoczułą metodę – tzw. *real-time* PCR, gdzie obecność genu jest przekładana na sygnał fluorescencyjny. W badanym materiale poszukuje się genu/allelu pochodzącego od płodu, a nieobecnego w genomie matki. (Tabela II).

Badanie ma charakter ilościowy, co pozwala stwierdzić, czy dodatni wynik badania pochodzi z DNA dziecka czy matki, gdyż stężenie DNA matczynego wielokrotnie przekracza śladową ilość DNA płodu.

Jak każde badanie diagnostyczne, oznaczanie genotypu płodu wiąże się z ryzykiem otrzymania wyników fałszywie dodatnich lub ujemnych. (Tabela III).

Te pierwsze, mogące wynikać z zanieczyszczenia próbki obcym DNA, spowodują u kobiet zimmunizowanych niepotrzebne monitorowanie ciąży technikami inwazyjnymi, a u kobiet bez przeciwciał anty-RhD niepotrzebne podanie immunoglobuliny anty-RhD, gdy dziecko jest RhD-ujemne.

Tabela I. Krytyczne elementy fazy przedanalizycznej – przygotowania materiału do nieinwazyjnych badań DNA płodu z osocza kobiety ciężarnej.

Czas pobrania materiału	od 16 tygodnia ciąży
Rodzaj materiału	<ul style="list-style-type: none"> 10-15ml krwi od matki do 2-3 probówek z napyłonym EDTA i barierą żelową, 2ml krwi ojca pobranej jak na morfologię
Przygotowanie materiału przed wystaniem do Pracowni Biologii Molekularnej	<ul style="list-style-type: none"> Krew matki: w ciągu 5h od pobrania odwirować osocze tak by bariera żelu oddzieliła je od elementów morfotycznych (<u>warunki wirowania ściśle wg zaleceń producenta probówek, nie otwierać probówek</u>) Krew ojca: nie wirować
Warunki przesyłania materiału	Przesłać w ciągu 24h w temperaturze pokojowej lub w stanie zamrożenia
Adres	Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Pracownia Biologii Molekularnej ul. Chocimska 5, 00-957 Warszawa
Dane na skierowaniu	Pacjentka: imię, nazwisko, PESEL, adres, tydzień ciąży, zgoda na badania genetyczne, telefon kontaktowy, ew. wywiad; informacja, gdy pacjentka lub jej partner innej rasy, nazwisko, telefon, adres lekarza prowadzącego

Tabela II. Interpretacja wyników amplifikacji genów/polimorfizmów płodu z osocza ciężarnych.

Amplifikacja genu/polimorfizmu:	Wynik PCR		
	Dodatni (+)	Ujemny (-)	Rozbieżny (+/-)
<i>CCR5</i>	izolowanie DNA całkowitego z osocza prawidłowe	brak DNA w badanym materiale - powtórzyć badanie	powtórzyć badanie z nowo izolowanego DNA
<i>RH*</i>	4 powtórzenia (+) płód Rh dodatni**	4 powtórzenia (-) najprawdopodobniej płód Rh ujemny***, skonfrontować z amplifikacją genu <i>SRY</i>	powtórzyć badanie
<i>SRY</i>	2 powtórzenia (+) płód jest chłopcem; potwierdzono obecność i jakość DNA płodowego w badanym materiale	2 powtórzenia (-) płód jest dziewczynką?; nie potwierdzono obecności i jakości DNA płodowego w badanym materiale, przeprowadzić amplifikację genu/polimorfizmu odziedziczonego od ojca	powtórzyć badanie
polimorfizm DNA odziedziczony od ojca, a nieobecny u matki	2 powtórzenia (+) płód jest dziewczynką, potwierdzono obecność i jakość DNA płodowego w badanym materiale	2 powtórzenia (-), nie potwierdzono obecności i jakości DNA płodowego w badanym materiale, powtórzyć badanie	powtórzyć badanie

* w zależności od typu konfliktu amplifikacja genu *RHD*, lub alleli *RHCE*c*, *E*
 ** w przypadku badań alleli *RHCE*c*, *E* = wykryto allel, do którego są przeciwciała
 ***w przypadku badań alleli *RHCE*c*, *E* = nie wykryto allelu, do którego są przeciwciała

Tabela III. Potencjalne przyczyny fałszywych wyników nieinwazyjnego oznaczania genu *RHD* płodu i ich konsekwencje.

	Wynik fałszywie dodatni	Wynik fałszywie ujemny
Potencjalne przyczyny	<ul style="list-style-type: none"> Zanieczyszczenie próbki obcym DNA Obecność u matki bądź płodu wariantu genu <i>RHD</i> (jest gen <i>RHD</i>, ale fenotyp RhD ujemny)* 	<ul style="list-style-type: none"> Za mało DNA płodu w próbce – zbyt wczesny okres ciąży Zła jakość DNA płodu, degradacja
Konsekwencje dla płodu i ciężarnej	Uznanie, że przeciwciała są groźne dla płodu i postępowanie tak jakby badań nieinwazyjnych nie wykonano.	Uznanie, że przeciwciała nie są groźne dla płodu i groźba zaniechania ewentualnego leczenia lub profilaktyki immunoglobuliną anty-D.

*zjawisko ekstremalnie rzadkie u osób rasy kaukaskiej; u rodzin rasy negroidalnej lub żółtej konieczność dodatkowych badań

Szczególnie niebezpieczne wyniki fałszywie ujemne wynikają głównie z braku DNA płodu w próbce. Opierając się na takim wyniku, lekarz może nie podjąć leczenia płodu z ChHP/N u kobiety z przeciwciałami. W przypadku kobiet bez przeciwciał anty-RhD, wynik fałszywie ujemny doprowadzi do niepodania immunoglobuliny anty-D. By wykluczyć ryzyko niewykrycia genu płodu, konieczne jest udowodnienie, że DNA płodu jest obecne w badanej próbce. Gdy płód jest płci męskiej badamy geny z chromosomu Y. Dla płodów płci żeńskiej konieczne jest poszukiwanie genu/polimorfizmu, który płód odziedziczył od ojca, a którego nie ma matka. Są one wieloetapowe i skomplikowane.

Nieinwazyjne badanie genotypu *RHD* płodu

Antygen D kodowany jest przez gen *RHD*, obecny w genomie osób RhD dodatnich. Występuje u 85% osób rasy kaukaskiej, 92% negroidalnej i 99% żółtej [12]. Podłoże genetyczne fenotypu RhD ujemnego jest bardzo różnorodne i odmienne u różnych grup etnicznych.

W rasie kaukaskiej 99% osób RhD ujemnych nie posiada genu *RHD*. W diagnostyce genetycznej daje to możliwość określania genotypu *RHD* poprzez badanie wprost obecności genu *RHD*. U osób innych ras i w znikomym odsetku osób rasy kaukaskiej, podstawą fenotypu RhD ujemnego jest niefunkcyjalny gen *RHD*. Gdy badania prenatalne dotyczą rodziny innej rasy niż kaukaska, należy to zaznaczyć na skierowaniu.

Jeśli gen *RHD* zostanie wykryty w osoczu RhD ujemnej matki, to pochodzi on od RhD dodatniego płodu. Ze względu na złożoną budowę genu *RHD* i występowanie licznych jego wariantów, w badaniu *real-time* PCR konieczne jest stosowanie więcej niż jednej pary primerów do różnych fragmentów *RHD*. Poszukuje się 3 fragmentów genu *RHD* (intron 4, ekson 7 i 10) [13].

Przez ostatnie 8 lat przebadano w IHiT 327 kobiet ciężarnych RhD ujemnych. W jednym przypadku badanie nieinwazyjne *RHD* płodu nie mogło być wykonane, ponieważ u ciężarnej występował wariant genu *RHD* (*IVS3+1G>A*), który nie ulega ekspresji (nie wytwarza białka RhD), ale uniemożliwia badanie genu płodu.

Orzińska A, et al.

We wszystkich pozostałych 326/327 przypadkach prawidłowo określono genotyp *RHD* płodu (240 dzieci *RHD* dodatnich; 86 *RHD* ujemnych). Gdy badanie wskazywało na płód RhD ujemny, wynik wydawano dopiero po udokumentowaniu, że w badanym DNA obecne było DNA płodu (w 49 wykryto gen *SRY* – urodzili się RhD ujemni chłopcy; w 36 wykryto inny polimorfizm odziedziczony po ojcu, a nieobecny u matki – urodziły się RhD ujemne dziewczynki).

W jednym przypadku nie znaleziono polimorfizmu różniącego rodziców i wynik nie został wydany. We wszystkich przypadkach RhD ujemnych dzieci, zalecono też powtórzenie badania w późniejszej ciąży. U 5 kobiet, od których krew pobrano w I trymestrze ciąży, uzyskano rozbieżne wyniki i dopiero ponowne badanie w II trymestrze pozwoliło jednoznacznie określić obecność genu *RHD* płodu i wydać wynik.

Nieinwazyjne badanie alleli genu RHCE

Mniej znany, lecz równie groźny, jest konflikt w zakresie antygeny c z układu Rh. Po antygenie RhD jest on najczęstszą przyczyną ChHP/N [14]. ChHP/N z powodu przeciwciał anti-c ma stosunkowo często ciężki przebieg i wymaga transfuzji dopłodowych lub/i wymiennych. Badanie nieinwazyjne alleli genu *RHCE* prowadzi się analogicznie do badania *RHD*, stosując swoiste dla nich primery i sondy [15]. Są one obecnie rutynowo wykonywane w IHiT [16].

W okresie ostatnich 3 lat zebrano i przebadano osocze od 22 zimmunizowanych kobiet ciężarnych Rhc ujemnych i uzyskano pełną zgodność wykrywania allelu *RHCE*c* w osoczu z fenotypem Rhc noworodków.

Allopreciwiłała anti-E z układu Rh, stosunkowo często wykrywane u ciężarnych, rzadko są przyczyną ChHP/N [12]. Zdarzają się jednak przypadki o bardzo ciężkim przebiegu [14]. W IHiT przebadano dotąd osocze 12 kobiet RhE ujemnych. U wszystkich wynik oznaczania allelu *RHCE*E* płodu był identyczny ze statusem RhE noworodka.

Perspektywy dalszych badań nieinwazyjnych

Badania nieinwazyjne kolejnych klinicznie istotnych antygenów erytrocytów, przede wszystkim antygeny K z układu Kell, kodowanego przez allel *KEL*1* oraz badania najistotniejszego z punktu widzenia klinicznego antygeny HPA-1a płytek krwi, natrafiają na trudności techniczne. W najnowszych badaniach nieinwazyjnych allelu *KEL*1* zastosowano zmodyfikowane primery o podwyższonej swoistości, tzw. LNA (*locked nucleic acids*) [17].

Pilotażowe badania DNA z osocza 10 ciężarnych K ujemnych, przeprowadzone w IHiT przy zastosowaniu tej procedury, potwierdzają możliwość wykrywania allelu *KEL*1*.

Dalsze badania nad doskonaleniem nieinwazyjnych badań prenatalnych wiążą się z analizą odmiennych właściwości fizykochemicznych DNA pochodzenia płodowego i matczyne (różnice w wielkości fragmentów DNA, w metylacji) [18, 19].

Podziękowania

Opracowanie metodyki nieinwazyjnych badań prenatalnych w konfliktach serologicznych było możliwe dzięki grantom KBN i MNiSW (nr 6PO5E12821 i nr 2PO5E02129), których inicjatorem i kierownikiem była prof. dr hab. med. Barbara Żupańska.

Dziękujemy też pracownikom laboratoriów i lekarzom, którzy zajmują się ciężarnymi, a także samym ciężarnym za zainteresowanie naszymi badaniami. Bez próbek osocza ciężarnych, badań serologicznych oraz obserwacji klinicznych nasze badania nie byłyby możliwe.

Praca zgłoszona na XXX Jubileuszowy Kongres Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego „Jakość życia kobiety - Salus feminae suprema lex esto” w dniach 16-19 września 2009 r. w Lublinie

Piśmiennictwo

1. Lenkiewicz B. Konflikt Rh po 25 latach stosowania immunoprofilaktyki. *Ginekol Pol.* 2001, 71, 863-868.
2. Daniels G, Finning K, Martin P, [et al.]. Fetal RhD genotyping: a more efficient use of anti-D immunoglobulin. *Transfus Clin Biol.* 2007, 14, 568-571.
3. Murray J, Karp L, Williamson R, [et al.]. Rh isoimmunization related to amniocentesis. *Am J Med Genet.* 1983, 16, 527-534.
4. Avent N, Finning K, Martin P, [et al.]. Prenatal determination of fetal blood group status. *Vox Sang.* 2000, 78, Suppl 2, 155-162.
5. Daniels G, Finning K, Martin P, [et al.]. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal blood group phenotypes: current practice and future prospects. *Prenat Diagn.* 2009, 29, 101-107.
6. Bischoff F, Hahn S, Johnson K, [et al.]. Intact fetal cells in maternal plasma: are they really there? *Lancet.* 2003, 361, 139-140.
7. Sekizawa A, Watanabe A, Kimura T, [et al.]. Prenatal diagnosis of the fetal RhD blood type using a single fetal nucleated erythrocyte from maternal blood. *Obstet Gynecol.* 1996, 87, 501-505.
8. Bianchi D, Zickwolf G, Weil G, [et al.]. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996, 93, 705-708.
9. Lo Y, Corbetta N, Chamberlain P, [et al.]. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997, 350, 485-487.
10. Lo Y, Tein M, Lau T, [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.
11. Lo Y, Zhang J, Leung T, [et al.]. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet.* 1999, 64, 218-224.
12. Daniels G. Rh blood group system. In: *Human Blood Group.* 2nd ed. Oxford: Blackwell Science, 2002.
13. 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.
14. Lenkiewicz B, Żupańska B. Significance of alloantibodies other than anti-D hemolytic disease of the fetus and newborn [HDF/N]. *Ginekol Pol.* 2003, 74, 48-54.
15. Legler T, Lynen R, Maas J, [et al.]. Prediction of fetal Rh D and Rh CcEe phenotype from maternal plasma with real-time polymerase chain reaction. *Transfus Apher Sci.* 2002, 27, 217-223.
16. Orzińska A, Guz K, Brojer E, [et al.]. Preliminary results of fetal Rhc examination in plasma of pregnant women with anti-c. *Prenat Diagn.* 2008, 28, 335-337.
17. Finning K, Martin P, Summers J, [et al.]. Fetal genotyping for the K [Kell] and Rh C, c and E blood groups on cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Transfusion.* 2007, 47, 2126-2133.
18. Chan K, Zhang J, Hui A, [et al.]. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem.* 2004, 50, 88-92.
19. Poon L, Leung T, Lau T, [et al.]. Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem.* 2002, 48, 35-41.