

Obecność „niemego” genu *RHD* u RhD ujemnej kobiety ciężarnej z przeciwciałami anti-RhD uniemożliwia określenie genotypu *RHD* płodu metodą nieinwazyjną

RHD variant in RhD/-/ mother with anti-D makes noninvasive fetal *RHD* genotyping impossible

Orzińska Agnieszka¹, Engel Karina², Łakomy Magdalena¹, Smolarczyk-Wodzyńska Justyna¹, Lipińska Anna³, Pelc-Kłopotowska Monika¹, Brojer Ewa¹

¹ Instytut Hematologii i Transfuzjologii

² Klinika Medycyny Matczyno-Płodowej i Ginekologii, Pomorska Akademia Medyczna

³ Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Szczecinie

Streszczenie

Nieinwazyjna diagnostyka *RHD* płodu w osoczu ciężarnych RhD ujemnych może być powszechnie stosowana u kobiet rasy kaukaskiej, bo nie ma u nich na ogół genu *RHD*. Jeśli DNA ekstrahowane z osocza zawiera gen *RHD*, to pochodzi on od płodu. Liczba kopii genu płodu w osoczu matki jest bardzo niska.

W prezentowanym przypadku kobiety RhD(-) z anti-RhD wykryto wysoką liczbę kopii genu *RHD*, co wskazywało, że pochodzi on od matki. Przeprowadzono następnie badania z płynu owodniowego.

Cel pracy: Omówienie trudności z interpretacją wyników badań.

Materiał i metody: Ciężarna z anti-D o fenotypie Ccdee. DNA izolowano: z osocza ciężarnej i z płynu owodniowego oraz z pełnej krwi ciężarnej i noworodka. W DNA z osocza i amniocytów badano *RHD* oraz *RHCE**c techniką real-time PCR. W DNA z krwi i amniocytów badano *RHD* i *RHCE**c, a z krwi dodatkowo genotypy *RHD*.

Wyniki: W DNA z osocza wykryto *RHD* na poziomie ilości *RHCE**c, co wskazywało, że obecny w osoczu *RHD* pochodzi z DNA matki. Badaniem z krwi ciężarnej zidentyfikowano „niemy” wariant *RHD*(*IVS3+1G>A*). Wyniki badania genu *RHD* w płynie owodniowym metodą real-time PCR i *CDE* SSP były rozbieżne (słabo dodatnie versus ujemne), więc nie określono RhD płodu. Dziecko urodziło się RhD(-), w jego DNA nie wykryto *RHD* żadną z metod.

Wnioski:

- 1) Wariant *RHD*(*IVS3+1G>A*) u RhD(-) ciężarnej uniemożliwił formalne oznaczenie *RHD* płodu z jej osocza.
- 2) Wysoka czułość real-time PCR sprawia, że metodą tą wykrywa się w płynie owodniowym śladową obecność genów matki.
- 3) Częstość wariantu *RHD*(*IVS3+1G>A*) w populacji polskiej wymaga dalszych badań.

Słowa kluczowe: **czynnik Rh / immunizacja / reakcja łańcuchowa polimerazy - PCR / diagnostyka prenatalna /**

Adres do korespondencji:

Agnieszka Orzińska
Instytut Hematologii i Transfuzjologii
00-957 Warszawa ul. Chocimska 5
tel. 022 34 96 611
e-mail: orzinska@ihit.waw.pl

Otrzymano: 10.08.2009
Zaakceptowano do druku: 30.09.2009

Orzińska A, et al.

Abstract

Objectives: Noninvasive fetal RHD genotyping from maternal plasma of RhD(-) pregnant women of Caucasian race may be used for predicting the risk of hemolytic disease because the RHD gene is usually absent in such populations. If detected in plasma of such women, the RHD gene originates from the RhD(+) fetus. The number of fetal copies of the gene in maternal plasma is extremely small. In the presented case of the RhD(-) pregnant woman with anti-D it was impossible to give a fetal RHD result due to mother's RHD(+) genotype. The fetal RHD was determined from amniocytes.

Aim: to present the difficulties related to the interpretation of results of invasive and noninvasive procedures.

Material and methods: whole blood, plasma and amniotic fluid of the RhD(-) woman with anti-D (14 week of pregnancy) as well as whole blood of the newborn. RHD and RHCE*c were genotyped by real-time PCR in DNA isolated from maternal plasma and amniocytes and the RHD and d-genotypes were tested by SSP methods in DNA isolated from whole blood and amniocytes.

Results: RHD and RHCE*c were detected in DNA isolated from plasma. The high level of RHD suggested its origin from the mother's DNA therefore it was impossible to determine the fetal RHD. The d-little test identified a RHD(IVS3+1G>A) variant in the mother's genome. A weak signal of real-time PCR for the RHD was obtained in amniocytes but the RHD was not detected by SSP. The RHCE*c was detected by both methods.

Results were inconclusive; the fetal RHD status remained unknown. The child was RhD(-) with RHD in its DNA undetected by either method.

Conclusions:

1/ The RHD(IVS3+1G>A) variant in the RhD(-) mother precluded formal noninvasive fetal RHD genotyping.

2/ Real-time PCR is too sensitive for amniocyte testing and may lead to false results as it detects trace maternal DNA in amniotic fluid

3/ The frequency of RHD(IVS3+1G>A) occurrence in Poland requires further studies.

Key words: **rhesus blood group / immunization / polymerase chain reaction - PCR / prenatal diagnosis /**

Wstęp

Powszechna immunoprofilaktyka konfliktu Rh, wprowadzona w Polsce 30 lat temu, prawie całkowicie, wyeliminowała chorobę hemolityczną płodów i noworodków (ChHPiN) o tym podłożu [1]. Jedną z przyczyn jest to, że w Polsce preparat immunoglobuliny (Ig) podaje się kobietom Rh ujemnym dopiero po porodzie. Immunoprofilaktyka dotyczy kobiet, u których nie wykrywa się przeciwciał, a których dziecko jest RhD dodatnie. Stosowana procedura nie zapobiega całkowicie wytwarzaniu przeciwciał. Mogą one powstawać już w ostatnich tygodniach ciąży na skutek zwiększonego przecieku matczyno-płodowego. Dlatego w innych krajach preparat immunoglobuliny podaje się już w 28 lub 34 tygodniu ciąży [2, 3]. Podawanie Ig wszystkim Rh ujemnym ciężarnym, niezależnie od faktycznego statusu Rh płodu, wiąże się z niepotrzebnym zużyciem preparatu, gdy dziecko jest RhD ujemne. Najnowsze badanie, wprowadzone w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii (IHIT) od 2005 roku, nieinwazyjna diagnostyka wykrywania genu *RHD* płodu w osoczu RhD ujemnej ciężarnej, pozwala ustalić RhD płodu, czyli przewidzieć realne ryzyko wystąpienia niezgodności lub konfliktu serologicznego [4]. U kobiet, które wytworzyły przeciwciała anti-RhD informacja jest ważna, bo gdy płód jest RhD ujemny (a przeciwciała są wynikiem poprzedniej ciąży) nie ma konieczności inwazyjnego monitorowania hemolizy i leczenia płodu.

Wykorzystanie badania dopplerowskiego wartości przepływu krwi w tętnicy środkowej mózgu z oceną maksymalnej prędkości skurczowej przepływu (MCA-PSV), opracowane przez Mari i wsp. pozwala na wiarygodną pośrednią ocenę stopnia niedokrwistości płodu oraz selekcję cięż w wymagających przeprowadzenia procedur inwazyjnych [5]. Badanie obrazowe w ciążach powikłanych immunizacją wykonuje się począwszy od 18 tygodnia ciąży. Po zmierzeniu maksymalnej prędkości przepływu (wartość bezwzględna w cm/s) uzyskany wynik odnosi się do wartości średniej dla danego wieku ciążowego, wyznaczając wielokrotność mediany korzystając z programu kalkulacyjnego.

Wartości nieprawidłowe przepływów stanowią wskazanie do przeprowadzenia niezwłocznej wewnątrzmacicznej transfuzji dopłodowej. Przy wartościach granicznych przepływów w MCA-PSV badanie dopplerowskie należy wykonywać codziennie.

Nieinwazyjne badanie antygeny RhD płodu z krwi matki może być stosowane u kobiet rasy kaukaskiej, ponieważ podstawą fenotypu RhD(-) jest u nich na ogół całkowity brak genu *RHD* [6].

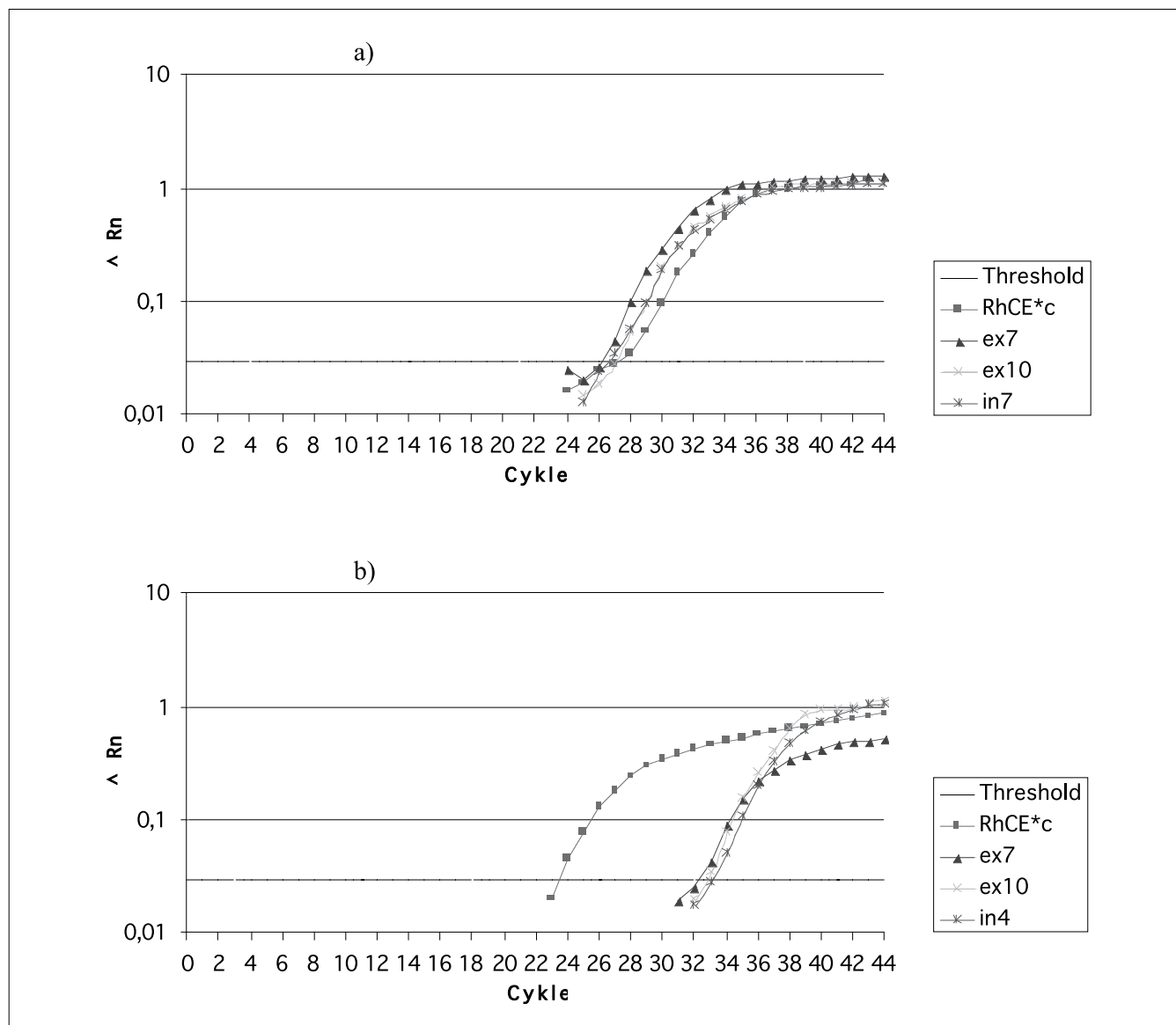
Jeśli w osoczu takiej ciężarnej wykryjemy gen *RHD*, to musi on pochodzić od RhD dodatniego płodu. Jednakże podłożem fenotypu RhD (-) u ludzi z innych ras często jest występowanie „niemych” wariantów genu *RHD* np.: pseudogenu *RHD Ψ* lub hybrydy *RHD-CE-RHD* [7]. Warianty te nazywamy „niemymi” genami, ponieważ z różnych przyczyn nie ulegają one ekspresji – czyli nie powstaje na ich podstawie białko – w tym przypadku białko RhD. Także w rasie kaukaskiej w populacji Europy Zachodniej opisano nieulegające ekspresji warianty genu *RHD*, ale częstość ich występowania jest bardzo niska [7]. Obecność genu *RHD* w genomie badanej ciężarnej, a przez to w jej osoczu, powoduje, że w badanym materiale nie można odróżnić genu *RHD* pochodzenia matczynego od płodowego.

W przedstawionej pracy prezentujemy przypadek kobiety RhD(-) pochodzenia polskiego, z przeciwciałami anti-RhD o wysokim mianie, u której zlecono badanie nieinwazyjne antygeny RhD płodu. Stwierdzenie, że dziecko jest zgodne z matką w zakresie antygeny RhD (czyli RhD ujemne), pozwoliłoby na uniknięcie leczenia kosztownym preparatem Ig anti-D. Jednakże badanie nie mogło być wykonane, gdyż w genomie kobiety wykryto „niemy”, nieulegający ekspresji gen *RHD*. Dla ustalenia, czy płód jest RhD(+), podjęto dalsze badania obecności genu *RHD* z płynu owodniowego inwazyjnie pobranego od płodu.

Cel pracy

Celem pracy jest omówienie trudności występujących w interpretacji wyników obu badań genetycznych.

Obecność „niemego” genu *RHD* u RhD ujemnej kobiety ciężarnej z przeciwciałami anti-RhD...



Rycina 1.

a) Wyniki wykrywania genu *RHD* u kobiety RhD ujemnej z „niemym” genem *RHD* techniką *real-time* PCR. Sygnał fluorescencji obserwowany jest już w 24-26 cyklu reakcji PCR, analogicznie jak sygnał fluorescencji wykrywania allelu *RHCE*c* obecnego u matki.

b) Wyniki wykrywania genu *RHD* płodu u kobiety RhD ujemnej noszącej RhD dodatni płód techniką *real-time* PCR. Sygnał fluorescencji genu *RHD* płodu obserwowany jest dopiero w 30-32 cyklu reakcji, a sygnał allelu *RHCE*c* już w 23 cyklu.

Materiał i metody

Badania dotyczyły ciężarnej o fenotypie Ccdee – wieloródki, lat 25 (ciąża druga), z obciążonym wywiadem położniczym, u której w ciąży pierwszej doszło do wewnątrzmacicznego obumarcia płodu około terminu porodu z nieznannej przyczyny. Po porodzie drogami natury pacjentka otrzymała Immunoglobulinę anti-D w dawce 150µg. Pacjentka została skierowana do Kliniki Medycyny Matczyno-Płodowej w Szczecinie w 12 tygodniu ciąży z powodu stwierdzonego miana przeciwciał 1:256. Wobec trudności diagnostycznych podjęto współpracę z Instytutem Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie w celu ustalenia rzeczywistego statusu RhD płodu. Badano pełną krew i osocze ciężarnej w 13 tygodniu ciąży, płyn owodniowy w 14 tygodniu ciąży, krew ojca dziecka (o fenotypie CcDee) i noworodka.

DNA z krwi izolowano przy użyciu zestawu QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy), a z osocza i płynu owodniowego ekstraktozem easyMag (Biomerieux, Lion, Francja). Technika *real-time* PCR na aparacie ABI Prism 7700 w DNA z osocza i amniocytów badano obecność 3 fragmentów genów *RHD* (ekson 7, ekson 10 i intron 4) i genu *RHCE*c* (kodującego swoistość antygenową Rhc, obecną u matki i u dziecka). W DNA z pełnej krwi matki, noworodka i amniocytów techniką PCR z użyciem starterów swoistych dla allelu (tzw. *SSP-PCR sequence specific primers – polymerase chain reaction*) przy użyciu zestawu CDE-SSP (InnoTrain, Kronberg/Taunus, Niemcy) poszukiwano 14 fragmentów genu *RHD* (w tym wariantu *RHDΨ* i genu *RHCE*c*).

Orzińska A, et al.

Wyniki

W DNA wyizolowanym z osocza ciężarnej wykryto ekson 7, ekson 10 i intron 4 genu *RHD*. Poziom sygnału fluorescencyjnego wszystkich trzech fragmentów *RHD* był taki sam jak poziom sygnału dla genu *RHCE**c, co wskazywało, że wykryty gen *RHD* występuje w DNA matki. Nie można zatem było stwierdzić, czy w osoczu występuje też gen *RHD* pochodzący od płodu. Wyniki przedstawiono na rycinie 1a.

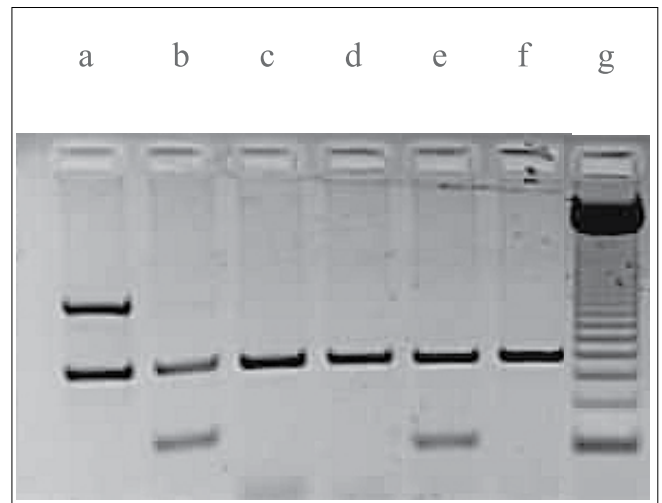
Dla porównania na rycinie 1b przedstawiono wyniki wykrywania genu *RHD* płodu w innej kobiecie RhD ujemnej w podobnym okresie ciąży. Sygnał fluorescencji dla genu płodu pojawia się w 33-34 cyklu reakcji PCR. Jeśli wykryty gen pochodzi od matki sygnał pojawia się wcześniej, już w 27-28 cyklu reakcji.

Obecność genu *RHD* u matki potwierdzono badając DNA z jej pełnej krwi. Wynik uzyskany metodą SSP-PCR wskazywał na obecność „niemego” wariantu *RHD*(IVS3+1G>A) w jej genomie, co uniemożliwiło formalne określenie genotypu *RHD* płodu metodą nieinwazyjną. (Rycina 2).

Po niepowodzeniu diagnostyki nieinwazyjnej przeprowadzono badanie genu *RHD* w DNA wyizolowanym z materiału pobranego od płodu. Technika *real-time* PCR w DNA z płynu owodniowego uzyskano wynik dodatni – wykryto 3 fragmenty genu *RHD*, lecz poziom fluorescencji dla każdego z badanych regionów był bardzo niski w porównaniu z poziomem sygnału genu *RHCE**c, obecnego u dziecka.

Sygnał fluorescencji dotyczący genu *RHCE**c uzyskano już w 27 cyklu reakcji. Gen *RHD* wykryto dopiero w 33-34 cyklu, co wskazuje na śladową ilość DNA zawierającego ten gen w badanym materiale. (Rycina 3).

Techniką SSP-PCR w tym samym materiale nie wykryto genu *RHD*, natomiast stwierdzono obecność genu *RHCE**c u dziecka. Ze względu na rozbieżne wyniki, uzyskane dwiema metodami PCR z inwazyjnie pobranego materiału, nie określono statusu RhD płodu. Dziecko urodziło się RhD(-), a w DNA wyizolowanym z jego krwi nie wykryto genu *RHD* żadną z zastosowanych technik PCR.

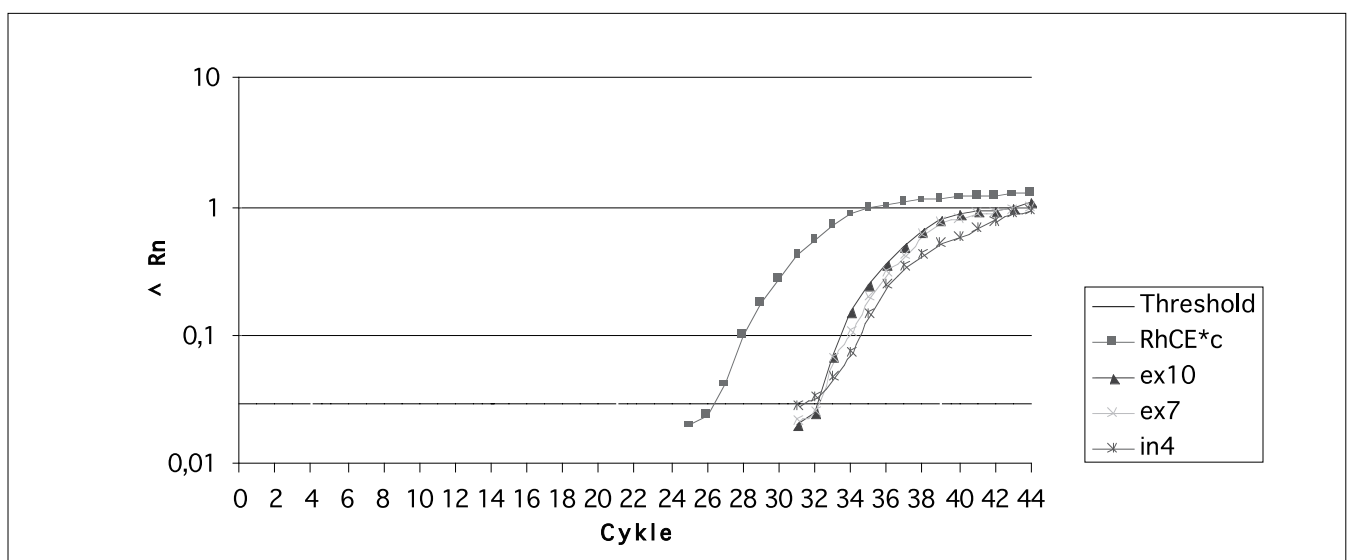


Rycina 2. Wynik badania genu *RHD* u kobiety ciężarnej RhD(-)/ *RHD*(+) testem *d-little* (Innotrain, Kronberg/Taunus, Niemcy): produkt PCR 940 par zasad – hybrydowy *Rhesus box* – świadczący, że badana osoba jest heterozygotą pod względem genu *RHD* (a); 150par zasad (b) i 127par zasad (e) charakterystyczne dla wariantu *RHD* (IVS3+1G>A).

Dyskusja

Nieinwazyjne badanie genu *RHD* płodu z osocza ciężarnej RhD ujemnej jest od czterech lat rutynowo wykonywane w IHiT. Stopień czułości i specyficzności badania oceniono na 99% [4].

Jak w każdym badaniu, w którym badane jest DNA, należy liczyć się z możliwością otrzymania fałszywie dodatnich wyników ze względu na obecność nie ulegających ekspresji wariantów poszukiwanego genu. Specyficznie do sekwencji genu *RHD* startery i sondy wykrywają także komplementarne regiony w wariantach „niemych”. Z tych powodów, w opisanym w pracy przypadku ciężarnej RhD(-) z wariantem *RHD*(IVS3+1G>A), gdzie mutacja dotyczy miejsca *splicingu*, niemożliwe było nieinwazyjne



Rycina 3. Wyniki wykrywania genu *RHD* płodu z amniocytów płodu techniką *real-time* PCR.

Obecność „niemego” genu *RHD* u RhD ujemnej kobiety ciężarnej z przeciwciałami anti-RhD...

oznaczenie genotypu *RHD* płodu z jej osocza. Inni autorzy, prowadzący nieinwazyjne badania genu *RHD* płodu u pacjentek RhD ujemnych z terenów Europy Zachodniej, także opisali podobne przypadki, u których niemożliwe było przeprowadzenie diagnostyki prenatalnej. Badacze holenderscy u 12/2380 ciężarnych RhD ujemnych wykryli nieulegające ekspresji geny *RHD* w genomie matek [8]. Warianty najczęściej wykrywane to pseudogen *RHDΨ*, zaś w jednym przypadku wariant *RHD(IVS3+1G>A)*, ten sam co prezentowany w obecnej pracy. U 563 belgijskich pacjentek badanie 6 osoczy dało wynik silnie *RHD* dodatni i w tej grupie (wszystkie te pacjentki były rasy negroidalnej) potwierdzono w genomie 4 matek obecność wariantu *RHDΨ*, a u 2 hybrydowego genu *RHD-CE-RHD* [9]. Powszechnie stosowany przez badaczy dobór starterów i sond komplementarnych do kilku eksonów równoległe, a w szczególności do miejsc o odmiennej sekwencji w najczęściej spotykanym wariantcie zmutowanym (np. ekson 4 *RHDΨ*), pozwala wyeliminować część fałszywie dodatnich wyników *RHD* płodu u ciężarnych z „niemym” genem *RHD* [10]. W przypadku opisywanej przez nas ciężarnej „niemy” gen nie był wariantem *RHDΨ*.

Gen *RHD* pochodzący od matki daje wynik fałszywie dodatni, który różni się ilościowo od wyniku prawdziwego uzyskiwanego dla *RHD* dodatniego płodu, co pozwala na ustalenie, że pochodzi od DNA matki. Jak wiadomo DNA płodu stanowi tylko około 3% DNA obecnego w osoczu – reszta to DNA matki [11].

Należy podkreślić, iż ewentualne nierozpoznanie, że uzyskany wynik jest fałszywie dodatni powoduje, że ciąża traktowana jest jako potencjalnie zagrożona wystąpieniem ChHPiN, a to może narazić pacjentkę na zbędne procedury monitoringu czy leczenia. Aby zminimalizować ryzyko błędnej diagnozy w procedurze badania osocza należy wprowadzić dodatkowe wytyczne co do stosowania kontroli, tak aby było możliwe ilościowe porównanie poziomu sygnału od genu *RHD* względem sygnału innego genu pochodzenia matczynego.

Opisany w prezentowanych badaniach gen *RHD(IVS3+1G>A)* u kobiety pochodzenia polskiego wymaga dalszej charakterystyki i określenia częstości występowania w naszej populacji. Ze wstępnych badań wynika, iż u 13/2907 osób polskiego pochodzenia oznaczonych serologicznie jako RhD ujemne wykrywa się fragment/ty genu *RHD*. W większości tych przypadków mamy jednak do czynienia z wykrywaniem tylko niektórych jego fragmentów. Częstość występowania nieulegających ekspresji genów *RHD* w rasie kaukaskiej jest krańcowo niska. Według niemieckich badaczy wykryty „niemy” gen *RHD(IVS3+1G>A)*, zaliczany do wariantów D_{el} , występuje z częstością 1:15000 w populacji europejskiej [7].

W Polsce nie przebadano jak dotąd wystarczająco licznej grupy osób RhD ujemnych by określić, jak często niemożliwe będzie wykonanie oznaczenia RhD płodu metodą nieinwazyjną u naszych pacjentek. Należy też pamiętać, że wzrastająca migracja ludności może przyczynić się do zwiększenia w naszym kraju liczby ciężarnych RhD ujemnych innych ras.

U ciężarnych RhD ujemnych z obecnym „niemym” genem *RHD* możliwe jest określenie statusu RhD płodu z inwazyjnie pobranego materiału od dziecka [12]. Jednakże zastosowanie techniki *real-time* PCR, ze względu na bardzo wysoką czułość (technika ta wykrywa nawet 1 kopię genu w badanym materiale), może wykrywać w płynie owodniowym śladowe ilości genów

pochodzących od matki i także dawać wyniki fałszywie RhD dodatnie. Ilościowe porównanie poziomu sygnałów dla genu pochodzenia matczynego, a innego genu, który na pewno występuje u dziecka (np. *RHCE*c*), pozwala na wykrycie tej niezgodności. Natomiast niska czułość klasycznej techniki PCR w porównaniu z metodą fluorescencyjną *real-time* PCR powoduje, że produkt amplifikacji śladowych ilości matczynego DNA nie jest wykrywany. Zbyt duża czułość techniki *real-time* PCR jest w tym przypadku powodem fałszywie dodatnich wyników badań. W analizowanym przypadku należało się oprzeć tylko na wynikach uzyskanych klasycznymi metodami PCR.

Wnioski

W przedstawionej pracy opisano pierwszy w Polsce przypadek ciężarnej RhD ujemnej, u której wykryto tzw. „niemy” gen *RHD*, co uniemożliwiło nieinwazyjne oznaczenie genotypu *RHD* dziecka. Fakt ten wskazuje na ograniczenia dotyczące tego badania prenatalnego, co jednak nie umniejsza jego ogólnej wartości w ocenie statusu RhD płodu dla prawidłowego i ekonomicznego prowadzenia ciąży u absolutnej większości kobiet RhD ujemnych.

Podziękowania

Dziękujemy pacjentce, lekarzom i pracownikom laboratoriów, którzy zajmują się ciężarnymi, za życzliwą współpracę w gromadzeniu materiału i danych do przedstawionej pracy.

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.]. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal blood group phenotypes: current practice and future prospects. *Prenat Diagn.* 2009, 29, 101-107.
3. Bowman J. Thirty-five years of Rh prophylaxis. *Transfusion.* 2003, 43, 1661-1666.
4. Brojer E, Żupanska B, Guz K, [et al.]. Non-invasive determination of fetal RHD status by examination of cell-free DNA in maternal plasma. *Transfusion.* 2005, 45, 1473-1480.
5. Mari G, Deter R, Carpenter R, [et al.]. Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunisation. Collaborative Group for Doppler Assessment of the blood Velocity in anemic Fetuses. *N Engl J Med.* 2000, 342, 9-14.
6. Daniels G. Rh blood group system. In: Human Blood Group. Ed. 2. Oxford: Blackwell Science, 2002.
7. Wagner F, Frohmajer A, Flegel W. RHD positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genet.* 2001, 2, 10.
8. van der Schoot C, Soussan A, Koelewijn J, [et al.]. Non-invasive antenatal RHD typing. *Transuss Clin Biol.* 2006, 13, 53-57.
9. Miron J, Gerard C, Senterre J, [et al.]. Routine fetal genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium. *Transfusion.* 2008, 48, 3733-3731.
10. Daniels G, van der Schoot C, Gassner C, [et al.]. Report of the third international workshop on molecular blood group genotyping. *Vox Sang.* 2009, 96, 337-343.
11. 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.
12. Avent N, Finning K, Martin P, [et al.]. Prenatal determination of fetal blood group status. *Vox Sang.* 2000, 78, Suppl 2, 155-162.