

Aktualny stan i perspektywy nieinwazyjnej diagnostyki prenatalnej w konfliktach matczyno- płodowych

Actual status and perspectives of the noninvasive prenatal diagnostics in feto-maternal incompatibilities

Katarzyna Guz, Agnieszka Orzińska, Izabella Kopeć, Magdalena Krzemienowska, Justyna Smolarczyk-Wodzyńska, Ewa Brojer

Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej
Instytutu Hematologii i Transfuzjologii

Streszczenie

Nieinwazyjna diagnostyka prenatalna jest oparta na analizie pozakomórkowego DNA płodu obecnego w osoczu kobiet w ciąży. W niniejszej pracy poglądowej autorki przeanalizowały przyczyny stosowania obecnie tej metodologii tylko do genotypowania niektórych antygenów krwinek czerwonych płodu. Podsumowały też doświadczenia Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w prenatalnej diagnostyce konfliktów matczyno- płodowych w zakresie antygenów RhD, RhC+D, Rhc, RhE i K oraz omówiły perspektywy rozwoju badań prenatalnych na podstawie nowoczesnych technologii: digital PCR, spektrometrii mas MALDI-TOF, sekwencjonowania nowej generacji.

Słowa kluczowe: nieinwazyjna diagnostyka prenatalna; choroba hemolityczna płodów/ noworodków, RhD, RhC, Rhc, RhE, K, HPA1a; genotypowanie, pozakomórkowe DNA płodu

J. Transf. Med. 2010; 4: 144–154

Summary

Non-invasive prenatal diagnostics is based on the analysis of cell free fetal DNA present in the plasma of pregnant women. In this review we analysed the reasons why this methodology can be currently used only for genotyping of some fetal red blood cell antigens. We also summarised the experience of the Institute of Haematology and Transfusion Medicine in prenatal diagnostics of feto-maternal incompatibilities against RhD, RhC+D, Rhc, RhE and K antigens and discussed the perspectives of development of prenatal tests based on modern technologies: digital PCR, mass spectrometry MALDI-TOF, new generation sequencing.

Key words: non-invasive prenatal diagnostics, hemolytic disease of newborn, RhD, RhC, Rhc, RhE, K, HPA1a, genotyping, cell free fetal DNA

J. Transf. Med. 2010; 4: 144–154

Wstęp

Pozakomórkowe DNA płodowe w osoczu matki (cff-DNA, *cell free fetal DNA*) odkryto w 1997 roku [1]. Stanowi 3–6% DNA izolowanego z osocza, jest wykrywalne już w 5–7 tygodniu ciąży. Jego stężenie wzrasta w trakcie ciąży, ale szybko zanika po porodzie — zatem wynik jego badania dotyczy aktualnej ciąży [2, 3], w odróżnieniu od komórek płodowych obecnych w krwiobiegu matki, które mogą pochodzić z poprzednich ciąż [4]. Analiza cff-DNA, mimo jego niewielkiej ilości, stała się możliwa dzięki ilościowej technice PCR (*polymerase chain reaction*) w czasie rzeczywistym (RQ-PCR, *real-time quantitative PCR*), szczególnie z wykorzystaniem sond TaqMan. Pierwsze prace wykorzystujące cff-DNA jako materiał do badań prenatalnych dotyczyły poszukiwania genów z chromosomu Y oraz genu *RHD*, najprostszych technicznie do wykrywania, ponieważ nie ma ich u matek (brak chromosomu Y u kobiet, brak genu *RHD* u większości osób RhD-ujemnych) [3, 5]. Dało to możliwość nieinwazyjnej diagnostyki najpowszechniejszego konfliktu serologicznego w zakresie antygeny RhD oraz analizy dziedziczenia chorób sprzężonych z płcią [5, 6].

Duże trudności metodologiczne napotkało natomiast badanie genów determinowanych przez polimorfizmy punktowe, tak zwane SNP (*single nucleotide polymorphism*), potrzebnych do nieinwazyjnej diagnostyki konfliktów serologicznych innych niż konflikt RhD lub różnych chorób uwarunkowanych genetycznie (np. w chromosomie X oraz w genach autosomalnych — między innymi β -talasemia, choroba Huntingtona, dystrofia mięśniowa, niedokrwistość sierpowata) oraz do wykrywania chromosomalnych anaploidii (m.in. trisomia 21, 18, 13; monosomia X i inne zaburzenia liczby chromosomów X/Y) [7–9]. W ostatnich latach nastąpił znaczący postęp w tej dziedzinie poprzez wykorzystanie innych technologii niż klasyczny RQ-PCR, takich jak *digital PCR* [10], spektrometria mas MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*) [11] oraz sekwencjonowanie nowej generacji [12], które omówiono w niniejszej pracy.

Zasadniczym celem prezentowanej pracy jest udzielenie odpowiedzi na pytania:

- jaka jest przydatność nieinwazyjnych badań prenatalnych?
- na czym polegają trudności w ich wykonywaniu?
- dla których konfliktów serologicznych badania nieinwazyjne są prowadzone w Polsce i na świecie i jakie są ich wyniki?
- co wymaga ulepszenia?

Przydatność nieinwazyjnej diagnostyki w konfliktach serologicznych

Konflikty matczyno-płodowe w antygenach krwinek czerwonych

Badania nad nieinwazyjną diagnostyką płodu w konfliktach serologicznych rozpoczęto na świecie pod koniec lat 90. XX wieku [1, 2], a od 2000 roku są prowadzone w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie (IHiT), gdzie wdrożono protokoły dla konfliktu w antygenach RhD, Rhc, RhE i RhC z układu Rh i w antygenie K z układu Kell [13–15]. Metody te są wykorzystywane przez ginekologów w przypadkach, gdy istnieje podejrzenie, że występujące u kobiety ciężarnej przeciwciała mogą spowodować chorobę hemolityczną płodów/norodków (HDFN, *hemolytic disease of the fetus and newborn*). Wiadomo, że przeciwciała obecne u matki mogą być groźne, jeśli płód nosi antygen, do którego są skierowane. Wykrycie genu lub allelu płodu, kodującego antygen niezgodny z matką (tj. *RHD*, *RHCE**C**, *RHCE**c**, *RHCE**E**, *KEL*1*) zawiąza grupę kobiet wymagających ścisłego monitorowania HDFN i ewentualnego leczenia. Jeśli dziecko jest antygenowo ujemne, co może mieć miejsce, gdy ojciec dziecka ma heterozygotyczny genotyp, to przeciwciała mu nie zagrażają, gdyż są wynikiem poprzedniej ciąży lub immunizacji przez przetoczenie krwi. Wykazanie braku szukanego genu/allelu płodu w osoczu matki, przy potwierdzeniu obecności cff-DNA wykryciem markera dziedziczonego po ojcu, stanowi argument do zaniechania inwazyjnych zabiegów pobierania materiału od płodu (amniopunkcja, kordocenteza), które zawsze wiążą się z około 1-procentowym ryzykiem utraty ciąży i dodatkową immunizacją matki [16].

W latach 2007–2008 w IHiT we współpracy z Regionalnymi Centrami Krwiodawstwa i Krwiolecnictwa przeprowadzono analizę wykrywania przeciwciał do antygenów krwinek czerwonych u kobiet ciężarnych w Polsce. Zebrano dane od grupy stanowiącej około 48% wszystkich ciężarnych [17]. Analizy te pozwoliły ocenić skalę immunizacji antygenem RhD i antygenami „nie-RhD” w Polsce i tym samym przewidzieć skalę ewentualnych badań nieinwazyjnych w ciążach zagrożonych HDFN. Szacuje się, że kobiet ciężarnych z przeciwciałami anti-D jest około 1000 rocznie. W około 400 przypadkach (40% kobiet teoretycznie powinno mieć RhD-ujemne płody) nieinwazyjne badanie *RHD* płodu pomogłoby wykluczyć konflikt matczyno-płodowy, a tylko pozostałe musiałyby być monitorowane pod kątem objawów HDFN. U kobiet RhD-ujem-

nych z rzadkimi przeciwciałami anti-G — obok nieinwazyjnego oznaczenia genu *RHD* istotne jest też oznaczenie statusu RhC płodu, ponieważ obecność *RHD* i/lub allelu *RHCE**C potwierdza ryzyko wystąpienia HDFN z powodu przeciwciał anti-G. Z przeprowadzonych badań wynika też, że kobiet ciężarnych z przeciwciałami do innych antygenów niż antygen RhD, tak zwany „nie-RhD”, jest szacunkowo 2000 rocznie. Wśród nich największy odsetek stanowią kobiety z przeciwciałami anti-K lub anti-c (25%, czyli ~500). Przeciwciała anti-K mogą wywołać ciężkie objawy HDFN [18], podczas gdy HDFN z powodu przeciwciał anti-c ma zazwyczaj łagodną postać, ale u 20% przypadków wymaga wymiennego przetoczenia krwi — stąd duże znaczenie diagnostyczne opracowanych nieinwazyjnych badań prenatalnych. Przeciwciała anti-E też są stosunkowo często wykrywane. Rzadko wywołują ciężką postać HDFN, ale notowano pojedyncze przypadki o takim przebiegu [19]. Wprowadzenie do praktyki klinicznej metody nieinwazyjnego genotypowania płodu jest więc zasadne. Dla diagnostyki pozostałych konfliktów matczyno-płodowych, między innymi w antygenie K, Fy^{a/b}, Jk^{a/b}, Co^a, Di^b, wciąż brakuje metod nieinwazyjnych, choć warto podkreślić, że stosunkowo rzadko wywołują one HDFN.

Znajomość statusu RhD płodu jest także ważna dla profilaktyki konfliktu RhD, prowadzonej u kobiet bez przeciwciał. W Polsce jak dotąd immunoglobulinę anti-D podaje się dopiero po porodzie, kiedy można oznaczyć antygen RhD z krwi dziecka. Taki schemat obniżył odsetek przypadków immunizacji anti-D w drugiej ciąży po urodzeniu pierwszego RhD-dodatniego dziecka z 13–20% do poziomu 1,6% [18]. Skuteczność obecnie stosowanego systemu profilaktyki szacuje się na około 90%. Przyczyny niepowodzenia wynikają głównie z zaniedbań w podawaniu immunoglobuliny anti-D, podania zbyt małych dawek w stosunku do liczby krwinek płodu przeciekających do krwiobiegu matki, z błędów w oznaczaniu antygenu RhD u noworodków, ale także z faktu, że u 1% kobiet Rh-ujemnych dochodzi do immunizacji już w trakcie pierwszej ciąży. Z tej przyczyny w wielu krajach wysoko rozwiniętych wprowadzono rekomendacje, by podawać immunoglobulinę anti-D 2-krotnie w 28 i 34 tygodniu ciąży albo jednorazowo w większej dawce w 34 tygodniu. Procedura taka zmniejsza częstość alloimmunizacji antygenem RhD do poziomu 0,3% [20]. Ponadto chroni aktualną ciążę, a nie dopiero następną, która może nie mieć miejsca wobec tendencji zmniejszającej się dzietności społeczeństw. W krajach stosujących ten schemat immunoprofilaktyki rozważa się możliwości i zasadność oznacza-

nia genu *RHD* płodu w osoczu matki w celu wykluczenia z immunoprofilaktyki kobiet z RhD-ujemnym płodem. W dyskusjach nad takim projektem podkreśla się, że ograniczenie liczby kobiet poddanych immunoprofilaktyce jest ważne z punktu widzenia ekonomii (oszczędzanie drogiego, deficytowego preparatu anti-D), aspektów etycznych (ograniczenie liczby dawców krwi szczepionych krwinkami RhD-dodatnimi do jego produkcji) oraz zdrowotnych (eliminacja ryzyka przeniesienia nieznanego czynnika zakaźnego w produkcie krwiopochodnym) [21]. Van der Schoot i wsp. przeanalizowała koszt wykonania takich badań u Rh-ujemnych ciężarnych i oszacowała, jak ich wprowadzenie wpłynie na koszty immunoprofilaktyki [20]. Według obecnie obowiązującego schematu w Holandii immunoglobulinę anti-D w ciąży otrzymują tylko kobiety nieposiadające dzieci. Ograniczenie to wynika ze względów ekonomicznych oraz ze względu na ograniczoną dostępność preparatu anti-D (w Holandii wytwarza się preparat anti-D tylko z osocza dawców holenderskich). W tym schemacie immunoprofilaktyki wprowadzenie nieinwazyjnego badania genu *RHD* płodu kosztowałoby tyle, ile immunoglobulina anti-D niepotrzebnie podana kobietom noszącym RhD-ujemne płody (3,1 mln v. 3 mln euro). Gdyby immunoprofilaktyką objęto wszystkie RhD-ujemne ciężarne, to nieinwazyjne badania przyczyniłyby się do 40% oszczędności (6,6 mln v. 3,9 mln euro).

Konflikty matczyno-płodowe w antygenach płytek krwi

Diagnostyka konfliktów w zakresie antygenów płytek krwi (HPA, *human platelets antigens*) czeka na opracowanie wiarygodnych metod nieinwazyjnych. Szczególnie potrzebna jest prenatalna diagnostyka konfliktu HPA1a, który stanowi 80–90% klinicznych przypadków alloimmunologicznej małopłytkowości płodów/novorodków (FNAIT, *fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia*), występującej z częstością około 1:1000–2400 urodzeń [22, 23]. Problem ten dotyczy kobiet ciężarnych o fenotypie HPA1a-ujemnym, czyli o genotypie *HPA1bb* (homozygoty w zakresie przeciwstawnego allelu *HPA*1b*), wykrywanego u 2% osób w populacjach kaukaskich. Z badań prospektywnych wynika, że odsetek kobiet HPA1a-ujemnych ulegających alloimmunizacji wynosi 10%, a u 31% z nich prowadzi to do ciężkich objawów FNAIT [24, 25]. Istotną różnicą w porównaniu z konfliktem RhD jest fakt, że 25–50% przypadków FNAIT z powodu przeciwciał anti-HPA1a pojawia się już w pierwszej ciąży [22]. Dlatego nieinwazyjne wykrycie allelu *HPA*1a* pło-

du jest ważne nie tylko dla diagnostyki ciąży z obciążonym wywiadem, ale także dla badań przesiewowych w celu rozpoznawania FNAIT w trakcie ciąży. Biorąc pod uwagę liczbę urodzeń z 2009 roku [26], w Polsce teoretycznie należałoby się spodziewać około 700 przypadków alloimmunizacji anty-HPA1a rocznie, w tym około 220 przypadków ciężkiej FNAIT ($41\,6437 \text{ urodzeń} \times 2\% \text{ ciężarnych HPA1bb} \times 85\% \text{ płodów HPA1a-dodatnich} \times 10\% \text{ ulegających alloimmunizacji} \times 31\% \text{ z ciężką FNAIT}$).

Trudności nieinwazyjnych badań prenatalnych i próby ich przewycięzania

Wykonywanie badań genów/alleli płodu w osoczu antygenowo ujemnej kobiety ciężarnej podejrzewanej o konflikt serologiczny jest wysoko specjalistycznym badaniem. Trudności w wykonaniu takich badań wynikają z kilku przyczyn, które szczegółowo omówiono poniżej.

Niskie stężenie cff-DNA i proporcja względem DNA matczynego

Dla wykrycia genów płodu konieczne jest wyizolowanie odpowiedniej ilości płodowego DNA. W osoczu, jak powiedziano we wstępie, występuje tylko nieznaczna ilość cff-DNA; przeważającą część stanowi pozakomórkowe DNA matczyne. Konieczne jest więc izolowanie DNA z dużej objętości osocza, a tym samym pobranie przynajmniej 15–20 ml krwi. Dodatkowo ważne jest, by ograniczać proces rozpadu komórek matki, ponieważ z nich jest uwalniane dodatkowe matczyne DNA. Przeciwdziała temu pobieranie krwi do probówek z barierą żelową i napyłonym EDTA (*ethylene-diamine-tetra-acetic acid*), które trzeba odwirować w ciągu 5 h, ściśle według zaleceń producenta, by nie spowodować zubożenia frakcji cff-DNA. W tak odseparowanym osoczu cff-DNA jest stabilne w temperaturze pokojowej do 48 h od pobrania i w takich warunkach może być transportowane do laboratorium diagnostycznego [27]. Probówkę zawierającą osocze, oddzielone od elementów morfotycznych barierą żelową, można też dostarczyć w stanie zamrożonym. Niedopuszczalne jest natomiast zamrażanie rozmrożonego osocza, ponieważ prowadzi to do degradacji cff-DNA. Ostatnio Fernando i wsp. z firmy Streck opisali nowy typ probówek przeznaczonych do badań prenatalnych, które nie mają bariery żelowej i nie wymagają odwirowania osocza, a cff-DNA jest w nich stabilne do 14 dni od pobrania [28].

Metoda izolowania DNA musi być efektywna, przeznaczona dla pozyskiwania drobnocząsteczkowe-

go DNA. Poleca się zestawy do izolowania kwasów nukleinowych wirusów, najlepiej z dużych objętości osocza ($\geq 1 \text{ ml}$) [29, 30]. Z uwagi na przewidywaną skalę badań i mniejsze ryzyko zanieczyszczenia „obcym” DNA (procedury dekontaminacyjne, bardziej zamknięty układ izolowania) duże oczekiwania wiąże się z wydajnymi metodami automatycznymi [30, 27]. Szczególnie przydatne wydają się metody z wykorzystaniem kuleczek magnetycznych opłaszczonych krzemionką, które lepiej wychwytyują drobnocząsteczkowe DNA niż metody ze złożem ubitym w kolumnie [31].

Metoda detekcji cff-DNA musi wykrywać pojedyncze kopie genów. Rutynowo używana obecnie metodologia RQ-PCR daje takie możliwości. Ważnym elementem jej standaryzacji jest wykazanie czułości wykrywania jednej kopii genu, poprzez sporządzenie krzywych wzorcowych z serii rozcieńczeń DNA pozyskanego od dawcy pozytywnego pod względem badanej cechy w DNA pozyskanym od osoby o przeciwstawnym genotypie.

Wszystkie 3 wymienione elementy analizy cff-DNA są bardzo ważne z uwagi na konieczność ograniczania ryzyka wydania fałszywie ujemnego wyniku badania prenatalnego (brak lub niska koncentracja cff-DNA w pobranym osoczu z powodu nieprawidłowego odwirowania lub przechowywania osocza; niska wydajność izolowania cff-DNA; mała czułość metody RQ-PCR). W przypadkach z klinicznym podejrzeniem HDFN (obecne alloprzeciwciała u matki) wyniki fałszywie ujemne wiążą się z szczególnie dużym niebezpieczeństwem. Opierając się na nich, lekarz może podjąć niewłaściwą decyzję o zaniechaniu leczenia płodu, które może się okazać konieczne dla ratowania zdrowia i życia dziecka. W badaniach profilaktycznych kobiet RhD-ujemnych bez przeciwciał uzyskanie wyniku fałszywie ujemnego wiąże się z mniejszym zagrożeniem — kobieta nie dostanie immunoglobuliny anti-D w ciąży, ale dostanie ją po porodzie, po określeniu fenotypu D dodatniego krwinek dziecka.

Charakter polimorfizmu badanego genu

Polimorfizm delecji genu — warianty genu *RHD*

Teoretycznie wykrywanie genu *RHD* płodu w osoczu ciężarnej RhD-ujemnej kobiety (czyli nieposiadającej genu *RHD*) powinno być technicznie proste, szczególnie, gdy operuje się tak czułą techniką, jak RQ-PCR. Tym niemniej w badaniu tym napotyka się na wiele trudności związanych ze zróżnicowanym podłożem genetycznym fenotypu RhD-ujemnego i występowaniem licznych wariantów genu *RHD*.

U 99% osób z populacji kaukaskiej podstawą fenotypu RhD-ujemnego jest brak całego genu *RHD*, natomiast u około 1% osób sekwencje genu *RHD* są obecne, ale z powodu różnych mechanizmów mutacji (SNP w regionach kodujących lub na styku intron-ekson, delecje/insercje, rekombinacje z genem *RHCE*) gen *RHD* jest нефункциональный, czyli nie powstaje białko RhD albo jest on odpowiedzialny za tworzenie wariantów białka RhD o obniżonej ekspresji (tzw. D słabe, Del) bądź pozbawionych części epitopów antygenowych (tzw. D częściowe) [19, 32]. Warianty D częściowe (większość hybryd *RHD-CE-D*; mutacje punktowe w sekwencjach kodujących zewnątrzkomórkowe fragmenty białka RhD) oraz D słabe (najczęściej mutacje punktowe w sekwencjach kodujących regiony przezbłonowe lub wewnątrzkomórkowe białka RhD; część hybryd *RHD-CE-D*) często nie są wykrywane w rutynowych badaniach serologicznych. Część z nich może być zidentyfikowana w bardziej zaawansowanych badaniach serologicznych z kombinacją różnych przeciwciał monoklonalnych. Warianty Del (najczęściej mutacje punktowe na styku intron-ekson, niektóre mutacje w sekwencji kodującej, delecje eksonu 8 lub 9 *RHD*) charakteryzują się natomiast tak słabą ekspesją, że są możliwe do wykrycia jedynie techniką adsorpcji/elucji. Bardziej szczegółowych informacji na temat częstości „niezwykłych” fenotypów Rh ujemnych w populacjach europejskich dostarczają badania genetyczne dawców krwi. Ogółem odsetek osób RhD-ujemnych z wariantem genu *RHD* w Niemczech wynosi 0,21% [32], w Austrii 0,4% [33], a w Polsce 0,45% [34].

W innych grupach etnicznych podłoże genetyczne fenotypu RhD-ujemnego jest odmienne: u 67% osób RhD-ujemnych w rasie negroidalnej jest obecny pseudogen *RHD Ψ* z duplikacją 37 par zasad (pz) w 4 eksonie *RHD* i mutacją nonsensowną w eksonie 6, a u 15% występuje gen hybrydowy *RHD-CE(3-9)-D* [19]. W rasie żółtej u 20–30% osób RhD-ujemnych są obecne różne allele *RHDel*, a u 4–6% hybrydy *RHD-CE(3-9)-D* [19]. Z omówionych powodów, diagnozując przypadek konfliktu RhD, powinno się znać pochodzenie etniczne rodziców.

W świetle tej wiedzy dla zapewnienia wiarygodności nieinwazyjnych badań *RHD* płodu jest konieczne badanie kilku fragmentów genu *RHD* [21, 29, 35]. W publikowanych pracach zastosowano różne strategie doboru starterów (tab. 1) [36–59]. Problem najbardziej optymalnego pod względem ekonomicznym doboru badanych fragmentów *RHD* był dyskutowany na ostatnich warsztatach genotypowania krwinki czerwonej w Berlinie podczas Zjazdu ISBT w 2010 roku, gdzie skłaniano się do wyku-

czenia badań eksonu 10 *RHD* jako często dającego wyniki fałszywie dodatnie z powodu obecności w genach hybrydowych, determinujących fenotyp RhD-ujemny. W protokole RQ-PCR opracowanym w IHiT oznacza się równolegle obecność intronu 4, eksonu 7 i 10 [13]. Ten dobór regionów pozwala na ewentualne wykrycie i zakwalifikowanie większości alleli *RHD*, z wyjątkiem mutacji punktowych i pseudogenu *RHD Ψ* , którego częstość w rasie kaukaskiej jest znikoma. Protokół umożliwi też różnicowanie, czy gen *RHD* pochodzi od matki czy od płodu, dzięki przyrównaniu poziomu wykrywania jego poszczególnych fragmentów do poziomu genu kontrolnego *CCR5*, wspólnego dla cff-DNA i DNA matczynego. Jeśli sygnał dla wszystkich lub części fragmentów *RHD* jest na poziomie genu *CCR5*, to niemożliwa staje się nieinwazyjna diagnostyka prenatalna, ponieważ mamy do czynienia z wariantem genu *RHD* u matki, który maskuje ewentualny gen *RHD* płodu [60].

Polimorfizmy punktowe

Nieinwazyjna diagnostyka konfliktów matczyno-płodowych determinowanych przez SNP jest bardzo trudna do badania klasyczną techniką RQ-PCR, ze względu na wysoki poziom niespecyficznego amplifikacji, powstający z przeważającej ilości DNA matczynego. Jedynie badanie alleli *RHCE**c**, *RHCE**E** genu *RHCE* daje zadowalające wyniki ze względu na to, że użyte startery zawierają dodatkowe SNP, prócz tych warunkujących antygeny Rhc czy RhE [49, 61, 10]. Wykrywanie allelu *RHCE**C** nie opiera się natomiast bezpośrednio na różnicach SNP, ale na analizie obecności insercji w intronie 2 genu *RHCE*, nieobecnej w sekwencji allelu *RHCE**c** [61].

Unikalną strategię badań RQ-PCR opracowano dla wykrywania płodowego allelu *KEL*1* [49]. Znaczne obniżenie poziomu niespecyficznego amplifikacji uzyskano poprzez modyfikację startera specyficznego dla allelu *KEL*1*, polegającą na wstawieniu dwóch analogów nukleotydów tak zwanych LNA (*locked nucleic acids*) tuż przed specyficznym nukleotydem dla *KEL*1* na końcu 3'. Niestety, sygnał specyficznego amplifikacji dla *KEL*1* jest słabszy niż w przypadku genu *RHD* i przez to generuje większy odsetek wyników fałszywie ujemnych we wczesnych ciążach.

Nowego pomysłu pokonania trudności technicznych badania SNP dostarcza prezentacja Schefera i wsp. ze zjazdu ISBT w Berlinie w 2010 roku, dotycząca konfliktu HPA1a [62]. W celu obniżenia poziomu niespecyficznego amplifikacji z DNA matki, autorzy proponują jego eliminację poprzez enzymatyczne wytrawianie. Odpowiednio dobrany enzym

Tabela 1. Nieinwazyjna diagnostyka prenatalna konfliktów matczyno-płodowych — doniesienia z lat 2005–2010**Table 1.** Non-invasive prenatal diagnostics of feto-maternal incompatibilities — the publications between 2005 and 2010

| Piśmiennictwo | Liczba kobiet | Tydzień ciąży | Badany fragment genu | Zastosowane geny kontrolne | Zastosowana procedura, modyfikacje | Specyficzność testu (%) | Czułość testu (%) |
|---------------|---|---------------|---|--|------------------------------------|--|--|
| Obecna praca | 348 RhD ⁻ 5 RhC ⁻ 21 Rhc ⁻ 22 RhE ⁻ 5 K ⁻ | ≥ 7 | <i>RHD</i> intron 4, ekson 7, 10 <i>RHCE</i> *C <i>RHCE</i> *c <i>RHCE</i> *E <i>KEL</i> *1 | <i>SRY</i> , 27 ins/del, <i>CCR5</i> | RQ-PCR | 99,7* | 100 |
| [36] | 24 | 11–38 | <i>RHD</i> ekson 7, 10 | <i>SRY</i> , <i>RHCE</i> , B-aktyna | RQ-PCR | 100 | 100 |
| [37] | 274 | 8–35 | <i>RHD</i> ekson 10 | – | Real-time PCR | 100 | 100 |
| [38] | 45 | 11–40 | <i>RHD</i> ekson 7, 10 <i>RHCE</i> *C/ <i>RHCE</i> *E | <i>SRY</i> , <i>RHCE</i> , B-aktyna | RQ-PCR | 100 100 100 | 100 100 100 |
| [39] | 20 | 11–16 | <i>RHD</i> ekson 7 | B-aktyna | RQ-PCR | 100 | 100 |
| [40] | 98 | Brak danych | <i>RHD</i> ekson 4, 5, 10 | <i>SRY</i> / /8 ins/del | RQ-PCR | 98 | 95,9 |
| [41] | 56 | 15–36 | <i>RHD</i> ekson 7, 10 | Bd | RQ-PCR | 100 | 100 |
| [42] | 45 | 28–30 | <i>RHD</i> ekson 5 (82bp), 7 dupleks | <i>SRY</i> / /8 ins/del | RQ-PCR | 100 | 100 |
| [43] | 81 | 4–41 | <i>RHD</i> ekson 10, intron 4 | – | RQ | 93,8 | 98,3 |
| [44] | 533 | 7–40 | <i>RHD</i> ekson 4, 5, 10 | <i>SRY</i> / /8 ins/del | RQ-PCR | 99,7 | 99,7 |
| [45] | 54 | I, III | <i>RHD</i> ekson 4, 7 | <i>RASSF1A</i> | RQ-PCR | 100 | 100 |
| [46] | 2359 | 30 | <i>RHD</i> ekson 7 | <i>CCR5</i> | RQ-PCR | 99,6 | 99,8 |
| [47] | 563 | 11–40 | <i>RHD</i> ekson 4, 5, 10 | <i>SRY</i> | RQ-PCR | 100 4, 5 ekson; 94,6 10 ekson | 86,8 4 ekson 97,1 5 ekson 96,9 10 ekson |
| [48] | 300 | 10–34 | <i>RHD</i> ekson 7, 10 (Free DNA Fetal Kit RhD) | (Free DNA Fetal Kit RhD) | RQ-PCR | 99 | 100 |
| [49] | 44 Rhc ⁻ 46 RhE ⁻ 13 RhC ⁻ 27 K | 10–36 | <i>RHCE</i> *c <i>RHCE</i> *E <i>RHCE</i> *C <i>KEL</i> *1 LNA | <i>CCR5</i> | RQ-PCR | 100 100 100 96,2 | 100 100 100 96,2 |
| [50] | 32 | II, III | <i>KEL</i> *1 | – | MALDI-TOF MS | 100 | 94 |
| [21] | 1869 | 8–38 | <i>RHD</i> ekson 5, 7 | <i>CCR5</i> | RQ-PCR | 99,2 | 99,84 |
| [51] | 13 | 12–39 | <i>RHD</i> ekson 10 | <i>SRY</i> | PCR, kapilarna elektroforeza | 100 | 100 |
| [52] | 78 | 14–40 | <i>RHD</i> ekson 5, 7, 10 | <i>SRY</i> , 9 loci STR | RQ-PCR | 93,3 | 100 |
| [53] | 140 | – | <i>RHD</i> 3 fragmenty | <i>SRY</i> , <i>RASSF1A</i> | RQ-PCR | 100 | 100 |
| [54] | 102 | – | <i>RHD</i> ekson 7, 10 | – | RQ-PCR | 92 | 100 |
| [55] | 21 | 20–39 | <i>RHD</i> ekson 5 | <i>B-globina</i> | RQ-PCR | 62,5 | 92,3 |
| [56] | 111 | 9–13 | <i>RHD</i> ekson 5, 7 | <i>B-globina</i> | RQ-PCR | 93 | 100 |
| [57] | 175 RhD ⁻ 53 Rhc ⁻ 78 RhE ⁻ 9 RhC ⁻ 48 K ⁻ | ≥ 9 | <i>RHD</i> ekson 5, 7 <i>RHCE</i> *c <i>RHCE</i> *E <i>RHCE</i> *C <i>KEL</i> *1 | <i>SRY</i> / /24 ins/del | RQ-PCR | 100 100 100 100 97,9 | 100 100 100 100 100 |
| [58] | 64 | 11–39 | <i>RHD</i> ekson 5, 7, 10 | <i>SRY</i> <i>CCR5</i> | RQ-PCR | 100 | 100 |
| [59] | 121 | 6–38 | <i>RHD</i> ekson 4 | <i>GADPH</i> | RQ-PCR | 99,2 | 100 |

*w 1/88 przypadków z wynikiem RhD-ujemnym nie znaleziono markera na potwierdzenie obecności cff-DNA

RQ-PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction) — reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym; MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption ionisation-time-of-flight mass spectrometry) — spektrometria mas techniką desorpcji laserowej z udziałem matrycy i analizatora czasu przelotu

restrykcyjny rozpoznaje i rozcina w miejscu SNP tylko sekwencję allelu *HPA*1b*, charakterystycznego dla DNA matki.

Konieczność potwierdzania obecności cff-DNA w badanej próbce

W każdym przypadku, w którym uzyska się wynik ujemny na poszukiwanie celowanego genu płodu, istnieje konieczność udowodnienia, że w próbce obecne było DNA płodu i że jego jakość i ilość były odpowiednie. Taki dowód uzyskuje się poprzez wykrycie genu/ów płodu, dziedziczonych po ojcu, a nie obecnych u matki. Dla płodów płci męskiej poszukuje się genu *SRY* z chromosomu Y, zawsze analizowanego w podstawowym protokole. Dla płodów płci żeńskiej jedyną możliwością jest, nie zawsze skuteczne, poszukiwanie ojcowskiego markera typu insercja/delecja (*ins/del*) [13, 57]. Pewne nadzieje wiązano z analizą epigenetyczną promotora genu *RASSF1A*, ponieważ płodowe sekwencje zawierają dużą ilość reszt metylowych (hipermetylacja), w odróżnieniu od sekwencji matczynej, z niewielkim odsetkiem reszt metylowych (hypometylacja) [45]. Enzymatyczne wytrawianie hypometylowanego DNA matki, a potem detekcja techniką RQ-PCR tylko metylowanych sekwencji promotora *RASSF1A* mają dowodzić obecności DNA płodowego w badanej próbce. Ta metodologia cechuje się niską specyficnością z powodu niecałkowitego dotrawienia matczynej DNA, co stwarza niebezpieczeństwo fałszywego potwierdzenia obecności materiału płodowego.

Niebezpieczeństwo kontaminacji obcym DNA na każdym etapie badania cff-DNA

Pojedyncze kopie drobnocząsteczkowego DNA z powszechnie występującymi genami, a do takich zalicza się gen *RHD* czy kontrolny gen *SRY*, mogą się przedostać do badanej próbki osocza zarówno w fazie przedanalizacyjnej (pobieranie krwi, separacja osocza), jak i analitycznej (izolowanie DNA, nastawianie reakcji RQ-PCR). „Obce DNA” może pochodzić z innej badanej próbki (kropelki krwi, osocza), z zanieczyszczonego sprzętu laboratoryjnego (wirówki, bloki grzejne, automatyczne ekstraktory DNA) lub stanowiska pracy, albo dostaje się do próbki z ciała operatora wykonującego badanie (złuszczonego naskórek, wydychane powietrze z mikrokropelkami śliny). Dlatego dla nieinwazyjnych badań prenatalnych poleca się odpowiedni sposób pobierania materiału (separacja osocza bez otwierania próbek) oraz wykonywania izolowania DNA

i detekcji RQ-PCR (odpowiedni strój laboranta, osobne pomieszczenia do izolacji i nastawiania RQ-PCR, w miarę możliwości praca w komorze laminarnej; regularne procedury czyszczenia sprzętu laboratoryjnego i stanowisk pracy). Sprawą bezdyskusyjną jest restrykcyjne przestrzeganie zasad zapobiegania kontaminacjom produktami PCR w laboratorium (odpowiednia organizacja pomieszczeń części „czystej” i „brudnej”).

Konsekwencje wydania wyniku fałszywie dodatniego z powodu powyższych przyczyn nie są wprawdzie tak duże jak w przypadku wyniku fałszywie ujemnego, ale mogą być fałszywym tropem, skłaniającym lekarza do wykonania zabiegu inwazyjnego (kobiety zimmunizowane), a w przypadku profilaktyki konfliktu RhD — do niepotrzebnego podania immunoglobuliny anti-D w ciąży.

Aktualny stan nieinwazyjnych badań płodu w konfliktach serologicznych w Polsce i na świecie

W celu podsumowania dotychczasowych badań prenatalnych w konfliktach serologicznych zestawiono je z doniesieniami opublikowanymi po 2004 roku (tab. 1). Jako parametry oceny autorki wybrały swoistość i specyficność używanych protokołów badań.

Do tej pory w IHiT przebadano 428 RhD-ujemne kobiety w ciąży. W 353 przypadkach było możliwe porównanie wyników nieinwazyjnego oznaczenia genu *RHD* płodu ze statusem RhD noworodka. U 5 kobiet nieinwazyjna diagnostyka *RHD* płodu nie była możliwa do przeprowadzenia ze względu na wykrycie u matki wariantów genu *RHD*: u 4 *D słabe*, u 1 wariant *RHDel (IVS3 + 1G > A)*. W pozostałych 348 przypadkach wyniki nieinwazyjnego oznaczenia *RHD* płodu były prawidłowe: w 260 RhD-dodatnie, a w 88 RhD-ujemne. W 5 osoczach z pierwszego trymestru ciąży sygnał RQ-PCR był zbyt niski i badania wymagały powtórzenia w drugim trymestrze. Obecność cff-DNA potwierdzono w 87/88 przypadkach: w 51 przez wykrycie genu *SRY* (noworodki były RhD-ujemnymi chłopcami), a w 36 przez wykrycie polimorfizmu insercja/delecja odziedziczonego po ojcu, a nieobecnego u matki (urodziły się RhD-ujemne dziewczynki). W jednym przypadku takiego polimorfizmu nie znaleziono i nie udało się potwierdzić obecności cff-DNA przy *RhD-ujemnym* wyniku.

U 5 kobiet RhD-ujemnych z rzadkimi przeciwciałami anti-G dodatkowo zbadano obecność allelu *RHCE*C*, kodującego swoistość RhC, równie groźną w tym przypadku, co RhD. U 2 kobiet wy-

kluczono obecność obu genów *RHD* i *RHCE**C, u 3 stwierdzono ich współwystępowanie.

Badania nieinwazyjne genów płodu przeprowadzono też u 21 kobiet ciężarnych z przeciwciałami anty-Rhc i 22 z przeciwciałami anty-RhE oraz u 5 kobiet z przeciwciałami anty-K. We wszystkich przypadkach wyniki nieinwazyjnej diagnostyki były prawidłowe.

Według doświadczeń autorek niniejszej pracy, testy nieinwazyjnej diagnostyki, wykorzystujące do kontroli cff-DNA, polimorfizmy insercja/delecja, są wiarygodne od 18. tygodnia ciąży. Dla badań we wcześniejszych etapach ciąży i opracowania nieinwazyjnej diagnostyki kolejnych konfliktów maczyno-płodowych, determinowanych SNP (np. w zakresie HPA1a płytek krwi), konieczne jest dalsze udoskonalanie procedur. Kierunki potencjalnych usprawnień przedstawiono poniżej.

Perspektywy usprawnienia badań DNA płodu w osoczu kobiet ciężarnych

Fizykochemiczne różnice między cff-DNA a DNA maczynym

Rozdział cff-DNA od DNA maczynego staje się możliwy dzięki wykryciu fizykochemicznych właściwości różniących oba rodzaje DNA, obecne w osoczu kobiet ciężarnych. Analiza porównawcza liczby i wzajemnej proporcji różnej wielkości amplikonów, powielających gen specyficzny dla cff-DNA lub wspólny z DNA maczynym, wykazała, że > 99% cff-DNA zawiera fragmenty mniejsze niż 300 pz, a większość DNA maczynego składa się z fragmentów większych niż 500 pz. Fragmenty DNA maczynego w osoczu kobiety ciężarnej są zdecydowanie dłuższe niż u mężczyzn i kobiet niebędących w ciąży [63, 64]. Wyniki badań techniką mikroskopii elektronowej struktur apoptycznych (tzw. *APO-bodies* [*apoptotic-bodies*]) obecnych w osoczu kobiet ciężarnych udowodniły, że cff-DNA jest uwięzione w małych strukturach odpowiadających pojedynczym nukleosomom (uwolnione mono-nukleosomy), zaś DNA matki jest zawarte w większych, niejednorodnych co do wielkości strukturach bogatych w chromatynę [65].

Trop różnicowania nukleosomów z cff-DNA i chromatyny z DNA maczynym zaowocował wykryciem różnic w budowie histonu H3: większość cff-DNA jest opleciona wokół histonu H3.1, charakterystycznego dla tkanek płodu, zaś DNA matki oplata histon H3.3, typowy dla komórek osób dorosłych. Na poziomie sekwencji białkowej oba podtypy histonów H3 różnią się kilkoma aminokwasami, co pozwala na ich separację przy użyciu przeciwciał

monoklonalnych. Odkrycie to zostało opatentowane, a metoda separacji z wykorzystaniem przeciwciał anty-H3.1 jest własnością firmy BIOCEPT, INC. San Diego, US (nr patentu USPTO 20070243549).

Separacja cff-DNA od DNA matki była przeprowadzana w żelach agarozowych, ale nie znalazła powszechnego zastosowania z uwagi na duże ryzyko kontaminacji i żmudność pracy przy tego typu manipulacjach [64, 66]. Nowe perspektywy wiążą się z elektroforezą kapilarną, szczególnie przeprowadzaną z wykorzystaniem technologii mikroukładów, tak zwanych *lab-on-chip* [67].

Opracowanie metody wzbogacenia frakcji cff-DNA być może będzie perspektywą poprawy nieinwazyjnej diagnostyki klasyczną metodą RQ-PCR różnych chorób, determinowanych przez SNP (nie tylko konflikty serologiczne), czy chromosomalnymi aneuploidiami.

Nowe technologie używane do genotypowania cff-DNA

Rynek nowych technologii badania kwasów nukleinowych bardzo prężnie się rozwija. W ciągu ostatnich 4 lat pojawiły się publikacje o jego wykorzystaniu do analizy cff-DNA z osocza kobiet ciężarnych [68]. Opisane metody pokonują trudności związane z niekorzystną proporcją cff-DNA względem DNA maczynego. Jedną z propozycji jest technika spektrometrii masowej MALDI-TOF, opierająca się na ilościowej analizie masy cząsteczkowej powielonych w PCR fragmentów genów, które dają różne wzory widm, nawet jeśli różnią się pojedynczym nukleotydem czy metylacją/demetylacją DNA [11]. Opublikowano pracę o badaniu allelu *KEL**1 płodu i genu kontrolnego *RASSF1* [50, 69]. W materiałach na stronie internetowej producenta systemu — firmy Sequenom — można znaleźć informacje o wynikach adaptacji techniki do konfliktu RhD.

Drugą aplikacją jest *digital* PCR, w którym wykorzystuje się możliwość badania pojedynczych kopii genów, dzięki prowadzeniu reakcji PCR w setkach kanalików, które są obecne w specjalnie konstruowanych mikrofluidowych płytkach [10]. Ze względu na mniejszą wielkość — cząsteczki cff-DNA efektywniej wnikają do tych kanalików i podnosi się odsetek wykrywanych genów płodu (w 3. trymestrze z 6% na 20% względem DNA matki) [70].

Trzecią techniką jest sekwencjonowanie nowej generacji, pozwalające na analizę ogromnej liczby genów jednocześnie. Propozycji metodologii i sprzętu jest kilka [71]. Na razie prace na temat analizy cff-DNA ograniczają się do dwóch producentów i dotyczą anaploidii, a autorzy podkreślają możliwość

wieloczynnikowego (w tysiącach sekwencji) potwierdzenia nieprawidłowej liczby chromosomów — na przykład trisomii chromosomu 13, 18, 21 [12]. Być może jest to pomysł na wieloaspektową analizę przyczyn konfliktu serologicznego — identyfikację różnych polimorfizmów grup krwi.

Wszystkie te technologie są jednak na razie w fazie opracowań i zmierzają do wytworzenia gotowych testów dla nieinwazyjnej diagnostyki prenatalnej, która będzie tania w przeliczeniu na jednostkowe badania, ale droga w aspekcie wyposażenia aparaturowego i wyszkolenia personelu. Zmierzają też do komercjalizacji badań. Powszechne ich stosowanie to kierunek rozwoju diagnostyki w przyszłości, ale na obecnym etapie najbardziej przystępną techniką genotypowania cff-DNA wciąż pozostaje RQ-PCR.

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. n. med. Barbara Żupańska.

Dziękujemy pracownikom laboratoriów i lekarzom, którzy zajmują się kobietami w ciąży, a także im samym za zainteresowanie naszymi badaniami — bez próbek osocza, badań serologicznych oraz obserwacji klinicznych nie byłyby możliwe.

Piśmiennictwo

- Lo Y., Corbetta N., Chamberlain P. i wsp. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350: 485–487.
- Lo Y., Tein M., Lau T. i wsp. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am. J. Hum. Genet.* 1998; 62: 768–775.
- Lo Y., Zhang J., Leung T., Lau T., Chang A., Hjelm N. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am. J. Hum. Genet.* 1999; 64: 218–224.
- Bianchi D., Zickwolf G., Weil G., Sylvester S., DeMaria M. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; 93: 705–708.
- Lo Y., Hjelm N., Fidler C. i wsp. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N. Engl. J. Med.* 1998; 339: 1734–1738.
- Costa J., Benachi A., Gautier E. New strategy for prenatal diagnosis of X-linked disorders. *N. Eng. J. Med.* 2002; 346: 1502.
- Avent N., Madgett T., Maddocks D., Soothill P. Cell-free fetal DNA in the maternal serum and plasma: current and evolving applications. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 2009; 21: 175–179.
- Chen C., Chern S., Wang W. Fetal DNA in maternal plasma: the prenatal detection of a paternally inherited fetal aneuploidy. *Prenat. Diagn.* 2000; 20: 355–357.
- Engel K., Płonka T., Bilar M., Orzińska A., Brojer E., Ronin-Walkowska E. The correlation between clinical characteristics of preeclampsia and the correlation of fetal DNA in maternal circulation. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2008; 139: 256–257.
- Zimmermann B., Grill S., Holzgreve W., Zhong X., Jackson L., Hahn S. Digital PCR: a powerful new tool for noninvasive prenatal diagnosis? *Prenat. Diagn.* 2008; 28: 1087–1093.
- Zhong X., Holzgreve W. MALDI-TOF MS in Prenatal Genomics. *Transfus. Med. Hemother.* 2009; 36: 263–272.
- Fan H., Blumenfeld Y., Chitkara U., Hudgins L., Quake S. Non-invasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008; 105: 16266–16271.
- Brojer E., Żupańska B., Guz K., Orzińska A., Kalińska A. Non-invasive determination of fetal *RHD* status by examination of cell-free DNA in maternal plasma. *Transfusion* 2005; 45: 1473–1480.
- Orzińska A., Guz K., Brojer E. i wsp. Preliminary results of fetal Rhc examination in plasma of pregnant women with anti-c. *Prenat. Diagn.* 2008; 28: 335–337.
- Orzińska A., Guz K., Brojer E. Nieinwazyjne badania prenatalne z osocza kobiet ciężarnych w konfliktach serologicznych w Polsce. *Gin. Pol.* 2009; 80: 768–771.
- Murray J., Karp L., Williamson R., Cheng E., Luthy D. Rh isoimmunization related to amniocentesis. *Am. J. Med. Genet.* 1983; 16: 527–534.
- Żupańska B., Nowaczek-Migas M., Michalik M., Michalewska B. Czy należy wykonywać badania przesiewowe u wszystkich ciężarnych w celu wykrycia przeciwciał innych niż anty-D? *Gin. po Dypl.* 2009; 2: 38–40.
- Lenkiewicz B. Konflikt Rh po 25 latach stosowania immunoprofilaktyki. *Gin. Pol.* 2000; 71: 863–868.
- Daniels G. *Human blood group.* Wyd. 2. Blackwell Science, Oxford 2002.
- van der Schoot C.E. Molecular genotyping in prenatal, donor and pre-transfusion testing. [www.ortho-wire.com common ppt C. Ellen van der Schoot, MD, PhD_ver3.pdf](http://www.ortho-wire.com/common/ppt/C_Ellen_van_der_Schoot_MD_PhD_ver3.pdf); 08.09.2010.
- Finning K., Martin P., Summers J., Massey E., Poole G., Daniels G. 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.
- Bussell J. Diagnosis and management of the fetus and neonate with alloimmune thrombocytopenia. *J. Thromb. Haemost.* 2009; 7 (supl. 1): 253–257.
- Kaplan C. Neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Haematologica* 2008; 93: 805–807.
- Kamphuis M., Paridaans N., Porcellijn L. i wsp. Screening in pregnancy for fetal or neonatal alloimmune thrombocytopenia: systematic review. *BJOG* 2010; 117 (11): 1335–1343.
- Maslanka K., Guz K., Żupańska B. Antenatal screening of unselected pregnant women for HPA-1a antigen, antibody and alloimmune thrombocytopenia. *Vox Sang.* 2003; 85: 326–327.
- Rocznik demograficzny 2009. Dmochowska H. (red.). Zakład Wydawnictw Statystycznych, Warszawa 2009: 254.
- Orzińska A., Guz K., Gala K., Brojer E. Wpływ warunków pobierania i przechowywania materiału oraz izolacji DNA na wyniki wykrywania genów płodu w osoczu kobiet ciężarnych w celu nieinwazyjnych badań prenatalnych. *Diagn. Lab.* 2007; 43: 69–77.

28. Fernando M., Chen K., Norton S. i wsp. A new methodology to preserve the original proportion and integrity of cell-free fetal DNA in maternal plasma during sample processing and storage. *Prenat. Diagn.* 2010; 30: 418–424.
29. Legler T. Prenatal rhesus testing. *Vox Sang.* 2010; 5: 7–11.
30. Clausen F., Krog G., Rieneck K., Dziegiel M. Improvement in fetal DNA extraction from maternal plasma. Evaluation of the NucliSens Magnetic Extraction system and the QIAamp DSP Virus Kit in comparison with the QIAamp DNA Blood Mini Kit. *Prenat. Diagn.* 2007; 27: 6–10.
31. Legler T., Liu Z., Heermann K. i wsp. Specific magnetic bead-based capture of free fetal DNA from maternal plasma. *Transfus. Apher. Sci.* 2009; 40: 153–157.
32. Flegel W., von Zabern I., Wagner F. Six years' experience performing *RHD* genotyping to confirm D-red blood cell units in Germany for preventing anti-D immunizations. *Transfusion* 2009; 49: 465–471.
33. Polin H., Danzer M., Gaszner W. i wsp. Identification of *RHD* alleles with the potential of anti-D immunization among seemingly D-blood donors in Upper Austria. *Transfusion* 2009; 49: 676–681.
34. Pelc-Kłopotowska M., Orzińska A., Michalewska B. i wsp. Badanie obecności fragmentów genu *RHD* u dawców RhD-ujemnych z zastosowaniem minipulowania i technologii real-time PCR. *J. Transfus. Med.* 2008; 1: 40–45.
35. Daniels G., Finning K., Martin P., Massey E. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal blood group phenotypes: current practice and future prospects. *Prenat. Diagn.* 2009; 29: 101–107.
36. Hromadnikova I., Vechetova L., Vesela K., Benesova B., Doucha J., Vlk R. 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.
37. Gautier E., Benachi A., Giovangrandi Y. i wsp. Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: a two year experience. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2005; 192: 666–669.
38. Hromadnikova I., Vechetova L., Vesela K. i wsp. Non-invasive fetal *RHD* exon 7 and exon 10 genotyping using real-time PCR testing of fetal DNA in maternal plasma. *Fetal Diagn. Ther.* 2005; 20: 275–780.
39. Gonzalez-Gonzalez C., Garcia-Hoyos M., Trujillo-Tiebas M. i wsp. Application of fetal DNA detection in maternal plasma: a prenatal diagnosis unit experience. *J. Histochem. Cytochem.* 2005; 53: 307–314.
40. Zhou L., Thorson J., Nugent C., Davenport R.D., Butch S.H., Judd W.J. 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.
41. Clausen F., Krog G., Rieneck K. i wsp. Reliable test for prenatal prediction of fetal RhD type using maternal plasma from RhD negative women. *Prenat. Diagn.* 2005; 25: 1040–1044.
42. Grootkerk-Tax M.G., Soussan A.A., de Haas M., Maaskant-van Wijk P.A., van der Schoot C.E. Evaluation of prenatal *RHD* typing strategies on cell-free fetal DNA from maternal plasma. *Transfusion* 2006; 46: 2142–2148.
43. Machado I., Castilho L., Pellegino J., Barini R. Fetal *RHD* genotyping from maternal plasma in a population with a highly diverse ethnic background. *Rev. Assoc. Med. Bra.* 2006; 52: 232–235.
44. Daniels G., Finning K., Martin P., Summers J. Fetal blood group genotyping: present and future. *Ann. NY Acad. Sci.* 2006; 1075: 88–95.
45. Chan K., Ding C., Gerovassili A. i wsp. Hypermethylated *RASSF1A* in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. *Clin. Chem.* 2006; 52: 2211–2218.
46. van der Schoot C., Soussan A., Koelwijn J., Bonsel G., Paget-Christiaens LG., de Haas M. Non-invasive antenatal *RHD* typing. *Trans. Clin. Biol.* 2006; 13: 53–57.
47. Minon J.M., Gerard C., Senterre J.M., Schaaps J.P., Foidart J.M. Routine fetal *RHD* genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium. *Transfusion* 2008; 48: 373–381.
48. Rouillac-Le Sciellour C., Sérazin V., Brossard Y. i wsp. Noninvasive fetal *RHD* genotyping from maternal plasma. Use of a new developed Free DNA Fetal Kit RhD. *Transfus. Clin. Biol.* 2007; 14: 572–577.
49. Finning K., Martin P., Summers J., Daniels G. 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.
50. Li Y., Finning K., Daniels G., Hahn S., Zhong X., Holzgreve W. Noninvasive genotyping fetal Kell blood group (*KEL1*) using cell-free fetal DNA in maternal plasma by MALDI-TOF mass spectrometry. *Prenat. Diagn.* 2008; 28: 203–208.
51. Kimura M., Sato C., Hara M., Ishihara O., Ikebuchi K. Non-invasive fetal *RHD* genotyping by maternal plasma with capillary electrophoresis. *Transfusion* 2008; 48: 1156–1163.
52. Wang X.D., Wang B.L., Ye S.L., Liao Y.Q., Wang L.F., He Z.M. Non-invasive foetal *RHD* genotyping via real-time PCR of foetal DNA from Chinese RhD-negative maternal plasma. *Eur. J. Clin. Invest.* 2009; 39: 607–617.
53. Hyland C.A., Gardener G.J., Davies H. i wsp. Evaluation of non-invasive prenatal *RHD* genotyping of the fetus. *Med. J. Aust.* 2009; 191: 21–25.
54. Chinen P.A., Nardoza L.M., Martinhago C.D. i wsp. Non-invasive determination of fetal Rh blood group, D antigen status by cell-free DNA analysis in maternal plasma: experience in a Brazilian population. *Am. J. Perinatol.* 2010; 27 (10): 759–762.
55. Mohammed N., Kakal F., Somani M., Zafar W. Non-invasive prenatal determination of fetal RhD genotyping from maternal plasma: a preliminary study in Pakistan. *J. Coll. Physicians Surg. Pak.* 2010; 20: 246–249.
56. Cardo L., García B.P., Alvarez F.V. Non-invasive fetal *RHD* genotyping in the first trimester of pregnancy. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2010; 48: 1121–1126.
57. Scheffer P., de Haas M., van der Schoot C., Bossers B., Ligthart P., Schuitemaker L. Non-invasive fetal blood group genotyping with DNA from maternal plasma: a seven-year clinical experience. *Vox Sang.* 2010; 99 (supl. 1): 25.
58. Amaral D.R., Castillo L. Fetal *RHD* genotyping by analysis of maternal plasma in a mixed population. *Vox Sang.* 2010; 99 (supl. 1): 25.
59. Wikman A., Tiblad E., Karlsson A., Westgren M., Lundahl J. Detection of fetal *RHD* DNA in maternal plasma in early pregnancy in an antenatal screening program. *Vox Sang.* 2010; 99 (supl. 1): 25–26.
60. Orzińska A., Engel K., Łakomy M. i wsp. *RHD* variant in RhD/- mother with anti-D makes noninvasive fetal *RHD* genotyping impossible. *Ginekol. Pol.* 2009; 80: 786–790.
61. Legler T., Lynen R., Maas J. i wsp. Prediction of fetal RhD and RhCcEe phenotype from maternal plasma with real-time polymerase chain reaction. *Transfus. Apher. Sci.* 2002; 27: 217–223.
62. Scheffer P., de Haas M., Oepkes D., AitSoussan A., Page-Christiaens G., van der Schoot C. Noninvasive fetal genotyping of

- human platelet antigen HPA 1a using cell-free fetal DNA isolated from maternal blood. *Vox Sang.* 2010; 99 (supl. 1): 73.
63. Chan K., Zhang J., Hui A. i wsp. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin. Chem.* 2004; 50: 88–92.
64. Li Y., Zimmermann B., Rusterholz C., Kang A., Holzgreve W., Hahn S. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clin. Chem.* 2004; 50: 1002–1011.
65. Bischoff F., Lewis D., Simpson J. Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure. *Human Reproduction Update* 2005; 11: 59–67.
66. Hromadnikova I., Zejskova L., Doucha J., Codl D. Quantification of fetal and total circulatory DNA in maternal plasma samples before and after size fractionation by agarose gel electrophoresis. *DNA Cell Biol.* 2006; 25: 635–640.
67. Hahn T., Drese K., O'Sullivan C. Microsystem for isolation of fetal DNA from maternal plasma by preparative size separation. *Clin. Chem.* 2009; 55: 2144–2152.
68. Raymond F., Whittaker J., Jenkins L., Lench N., Chitty L. Molecular prenatal diagnosis: the impact of modern technologies. *Prenat. Diagn.* 2010; 30: 674–681.
69. Bellido M.L., Radpour R., Lapaire O. i wsp. MALDI-TOF mass array analysis of RASSF1A and SERPINB5 methylation patterns in human placenta and plasma. *Biol. Reprod.* 2010; 82: 745–750.
70. Lun F., Chiu R., Chan K., Leung T., Lau T., Lo Y. Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clin. Chem.* 2008; 54: 1664–1672.
71. Voelkerding K., Dames S., Durtschi J. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin. Chem.* 2009; 55: 641–658.