

Nieinwazyjne badania antygenów krwi płodu z osocza matki

Komentarz do artykułu „Aktualny stan i perspektywy nieinwazyjnej diagnostyki prenatalnej w konfliktach matczyno-płodowych” w świetle najnowszych doniesień prezentowanych na XXXI Międzynarodowym Kongresie *International Society of Blood Transfusion*

Non-invasive fetal blood group genotyping from maternal plasma — the newest reports from the XXXI International Congress of the International Society Blood Transfusion
A commentary to “Actual status and perspectives of the noninvasive prenatal diagnostics in feto-maternal incompatibilities”

Agnieszka Orzińska

Instytut Hematologii i Transfuzjologii

Streszczenie

W pracy zaprezentowano najnowsze doniesienia dotyczące nieinwazyjnych badań antygenów krwi płodu z osocza kobiet ciężarnych — aktualny stan wiedzy i doświadczeń klinicznych z tego zakresu oraz stosowane rozwiązania techniczne przedstawione na XXXI Międzynarodowym Kongresie International Society of Blood Transfusion.

Słowa kluczowe: nieinwazyjna diagnostyka płodu; genotypowanie; RHD; RHCE; KEL*1

J. Transf. Med. 2010; 4: 155–158

Summary

This article contains the newest reports about non-invasive fetal blood group testing from maternal plasma — current state of knowledge, clinical experience and technical improvements presented during the XXXI International Congress of the International Society Blood Transfusion.

Key words: non-invasive fetal diagnostics; genotyping; RHD; RHCE; KEL*1

J. Transf. Med. 2010; 4: 155–158

Nieinwazyjna diagnostyka płodu z osocza matki to jedna z najszybciej rozwijających się obecnie gałęzi diagnostyki. Wolno krążące DNA płodowe jako nowe źródło informacji o przyszłym dziecku

stwarza ogromne potencjalne możliwości diagnostyczne. Najnowsze doniesienia z tego zakresu przyniósł XXXI Międzynarodowy Kongres *International Society Blood Transfusion* (ISBT), który odbył

się w tym roku w Berlinie. Przedstawione materiały ze zjazdu stanowią najświeższe uzupełnienie informacji o badaniach opisanych przez Katarzynę Guz i wsp. w artykule „Aktualny stan i perspektywy nieinwazyjnego genotypowania antygenów płodu z osocza matki w konfliktach serologicznych”.

Podczas Kongresu temat nieinwazyjnych badań antygenów krwi płodu, zwłaszcza w odniesieniu do badań układu Rh, był omawiany na wykładzie w sesji pediatrycznej pt. *Pediatric transfusion medicine* i na odrębnej sesji immunologii matczyno-płodowej pt.: *Fetal-Maternal Immunology*, a także podejmowany na spotkaniu Warsztatów Genotypowania Krwinki Czerwonej i sesji pt.: *Platelets-Risk of bleeding*. Przedstawiono kilkuletnie doświadczenia kliniczne i laboratoryjne zebrane w takich krajach, jak Holandia, Polska i Francja; oceniono przydatność metody w mieszanej etnicznie populacji Brazylii i możliwość zastosowania badania we wczesnej ciąży — doświadczenia Szwecji. Zaprezentowano nowe możliwości kontroli wewnętrznej obecności DNA płodu stosowane w Niemczech oparte na wykrywaniu polimorfizmów jednonukleotydowych. Na osobnej sesji dotyczącej płytek krwi zaprezentowano także doniesienie o genotypowaniu antygenów płytkowych z układu HPA1 u płodu z wykorzystaniem osocza matki.

Na wykładzie dotyczącym diagnostyki prenatalnej antygenów z układu Rh profesor Legler (Getynga, Niemcy) omówił stan badań wdrożonych obecnie do pracy klinicznej. Najczęściej dostępną obecnie usługą diagnostyczną jest typowanie antygeny D płodu, lecz także w niektórych ośrodkach Europy Zachodniej, w tym w Polsce, są dostępne testy do określania genotypu antygenów c, E i C dziecka [1]. Nieinwazyjna diagnostyka może być prowadzona we wczesnej ciąży (jednak nie wcześniej niż w 9 tygodniu ciąży), lecz stężenie DNA przed 12 tygodniem ciąży może wynosić poniżej poziomu detekcji metody. Dlatego powszechnie zaleca się powtórzenie badania w późniejszym okresie, gdy wynik wskazuje, że płód jest RhD-ujemny. Taka adnotacja powinna być podawana na wyniku wystawianym dla pacjentki. Podczas wykładu zaprezentowano niemieckie wytyczne dotyczące fazy przedanalizycznej badania i wyniki badań dotyczące stężenia całkowitego i płodowego DNA wykrywanego w osoczu z próbek krwi transportowanych do 8 dni od pobrania. Wykazano wysoką stabilność materiału płodowego w zakresie 5 dni, przy podwyższającym się poziomie matczynego DNA od 2 dnia. Ze względu na to, że późniejsza separacja daje zbyt wysoki poziom DNA uwolnionego z komórek matki i obniża istotnie czułość testu, zalecano separa-

cję osocza od elementów morfotycznych w ciągu 2 dni od pobrania.

Przedyskutowano różne metody ekstrakcji kwasów wykorzystywane obecnie na świecie do badań nieinwazyjnych genotypu płodu, wskazując na wysoką wydajność testu QIAamp DSP Virus Kit spośród zestawów do izolowania manualnego. Wśród metod automatycznych zaprezentowano porównanie ekstraktorów firmy Chemagen i firmy Roche (MagNaPure), który jest obecnie najpowszechniej używany w tego typu badaniach, i w obu przypadkach uzyskano pojedyncze fałszywie dodatnie wyniki, a aparat Roche wykazał się niższą czułością — 4/190 fałszywie ujemnych reakcji. Statystycznie istotnie wyższe stężenia DNA płodowego uzyskano metodami magnetycznymi (*magnetic tips*) w porównaniu z metodami „kolumnowymi” (*spin column*). Rozważano dobór badanych regionów genu *RHD*. Powszechnie zaleca się badanie genu *RHD* co najmniej w 2 eksonach równoległe, ze względu na występowanie licznych wariantów D dodatnich. Sugerowano, że technika wykrywająca wariant *RHD*Ψ powinna być włączona do badań tylko wtedy, gdy populacja, z której pochodzi pacjent, jest mieszana i są w niej osoby rasy negroidalnej i żółtej. Ponadto postulowano zaprzestanie badań z zastosowaniem starterów dla eksonu 10 genu *RHD*, gdyż prowadzi to do uzyskiwania fałszywie dodatnich wyników, zwłaszcza w badaniu rasy żółtej lub negroidalnej, i podwyższa koszt badań. Podobne uwagi dotyczące tego fragmentu genu wniesiono podczas dyskusji na spotkaniu Warsztatów Genotypowania Krwinek Czerwonych. Omawiano też opatentowane metody detekcji genów płodu — zestaw Free DNA Fetal Kit® *RHD* do *real-time* PCR lub świeżo wprowadzony zestaw SensiGene™ Fetal RhD Genotyping do badań techniką MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*).

Wykład o diagnostyce nieinwazyjnej zamykały rozważania o dalszych perspektywach rozwoju diagnostyki prenatalnej. Głównym zadaniem na przyszłość jest zastosowanie tego badania prenatalnego u wszystkich kobiet RhD-ujemnych tak, aby wprowadzić celowaną profilaktykę immunoglobuliną anti-D tylko u matek noszących RhD-dodatni płód. Obecnie jest to proponowane opcjonalnie ciężarnym RhD-ujemnym w kilku krajach Europy Zachodniej. Dodatkowo zaletą takiego programu może być identyfikowanie kobiet o fenotypie D słabe i wyłączenie ich z leczenia, wadą zaś — wykluczenie kobiet, dla których uzyskano wynik fałszywie ujemny. Podkreślono konieczność wprowadzenia uniwersalnej kontroli wyników ujemnych, zastosowania pełnej automatyzacji całego procesu oraz jego

standaryzacji przed dopuszczeniem programu do rutynowych badań przeglądowych ciężarnych RhD-ujemnych. Dzięki prowadzeniu przez ISBT regularnych międzynarodowych warsztatów z wykorzystaniem referencyjnego materiału genetycznego jest obecnie dostępna właściwa zewnętrzna kontrola jakości badań prenatalnych, którą można objąć także przyszłe programy profilaktyczne.

W kolejnych doniesieniach na sesji immunologii matczyno-płodowej prezentowano prace podsumowujące doświadczenia ośrodków prowadzących od wielu lat lub dopiero wdrażających badania nieinwazyjne. Badacze holenderscy przez 7 lat przeanalizowali grupę 365 kobiet RhD-; Rhc-; RhE- lub K- [2]. We wszystkich przypadkach proszono o zwrotne przesłanie wyniku dziecka lub krwi pępowinowej po porodzie w celu kontroli jakości świadczonych badań. W 10 przypadkach z powodu obecności wariantu *RHD* u matki, braku kontroli płodowego DNA lub niespecyficznego amplifikacji allelu *KEL*1* nie określono genotypu płodu. Jako kontrolę obecności DNA płodu w badanej próbce stosowano wykrywanie polimorfizmów dziedzicznych tylko po ojcu. Prowadzono badania nad wprowadzeniem uniwersalnej metody kontroli z zastosowaniem enzymu czulego na metylację. Jednak z danych badaczy wynika, że nowy sposób kontroli może prowadzić do fałszywego potwierdzenia wyniku *RhD*-ujemnego płodu, gdyż następuje niecałkowite strawienie DNA matczynego. Zaprezentowane dane dla trawienia pojedynczym enzymem lub równocześnie dwoma enzymami restrykcyjnymi zawsze wskazywały na niekompletne zachodzenie reakcji. Z tego względu w Holandii pozostano przy kosztownej i złożonej metodzie wykrywania polimorfizmów typu insercja delecja do potwierdzania wyniku ujemnego płodu.

Nowatorski sposób kontroli wewnętrznej zaprezentowali na Kongresie w swoim doniesieniu nie mieccy badacze [3]. Przeprowadzili multipleksowy PCR dla sekwencji genu *RHD* i 26 polimorfizmów jednonukleotydowych, wykorzystując metodę skanowania genu na aparacie ABI310. W 85% przypadków zastosowana koamplifikacja pozwoliła im potwierdzić obecność DNA płodu. Autorzy pracy sugerują, że przewagą metody jest możliwość wykrycia w DNA z osocza ciężarnej polimorfizmu nieobecnego u matki, bez konieczności badania krwi ojca.

W ramach wystąpienia ustnego pt.: *Non-invasive fetal blood group genotyping: the decade of Polish experience* zaprezentowano podsumowanie badań genotypu płodu z osocza 480 ciężarnych kobiet przebadanych na przestrzeni 10 lat w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii, jedynym ośrodku w Polsce

prowadzącym nieinwazyjną diagnostykę płodu z krwi matki [4]. Pełny opis zebranych wyników można znaleźć w artykule poglądowym dr Guz pt.: „Aktualny stan i perspektywy nieinwazyjnej diagnostyki prenatalnej w konfliktach matczyno-płodowych” publikowanym na łamach bieżącego numeru „Journal of Transfusion Medicine”.

Francuskie Narodowe Centrum Hemobiologii Perinatologicznej prezentowało wyniki badań wykonane przez rok działania tej placówki [5]. Nieinwazyjną diagnostyką objęto 1378 kobiet RhD-ujemnych, zarówno zimmunizowanych, jak i badanych w celach celowanej immunoprofilaktyki. W 18 przypadkach badanie nie było możliwe do wykonania (warianty genu *RHD* u matki lub zbyt niskie stężenie DNA w eluacie). W pozostałych zaś, używając ekstraktora easyMAG (Biomerieux) oraz zestawu komercyjnego Free DNA Fetal Kit® RhD do detekcji, określono prawidłowo obecność genu *RHD* u płodu. W tym ośrodku etap ekstrakcji DNA jest poddany szczególnej kontroli ze względu na możliwość zanieczyszczenia badanej próbki śladowymi ilościami RhD-dodatniego materiału: próbki osocza są izolowane pojedynczo, ekstraktor służy tylko do tego badania i jest w wydzielonym pomieszczeniu, a personel nosi ubranie ochronne także na włosy. Centrum prowadzi również diagnostykę inwazyjną innych antygenów płodu oraz oznacza zygocytowość pod względem genu *RHD* ojca, co jest ważnym elementem w programie planowania rodziny przez kobiety RhD-ujemne.

Z kolei celem doniesienia uczonych brazylijskich była próba odpowiedzi, czy rutynowo stosowane w Europie badanie *RHD* płodu jest możliwe i ekonomicznie uzasadnione w mieszanej populacji tego kraju [6]. Przebadanie eksonów 4, 5 i 10 genu *RHD* u 64 ciężarnych RhD-ujemnych w 100% przypadków pozwoliło prawidłowo przewidzieć fenotyp D dziecka. W 3 przypadkach wykryto pseudogen *RHD Ψ* u płodu, co wskazuje na duży udział tego podłoża genetycznego w fenotypie RhD-ujemnym ludności Brazylii w przeciwieństwie do krajów europejskich.

W doniesieniu badaczy szwedzkich skupiono się na wprowadzeniu prostej i wiarygodnej diagnostyki nieinwazyjnej *RHD* do programu profilaktycznego z naciskiem na okres wczesnej ciąży [7]. Porównano manualną (QIAamp Virus DSP) i automatyczną (Magna Pure LC) metodę izolowania DNA, uzyskując fałszywie dodatnie wyniki w metodzie ręcznej, przez co wykluczono ją z dalszych badań. Wynik badania sposobu przechowywania próbek krwi wykazał, że ich przechowywanie bez odwirowania do 72 h i mrożenie osocza nie mają wpływu

na wynik. W reakcji typu multipleks prowadzono detekcję eksonu 4 genu *RHD* z genem *GADPH* w 3 powtórzeniach. W protokole badania przyjęto wartości graniczne Ct dla genu *GADPH*, przy których badanie jest interpretowane, aby zminimalizować ryzyko wyników fałszywych dla genu *RHD*. Przebadano 170 osocz od ciężarnych RhD-ujemnych, 31 próbek wykluczono z powodu zbyt niskiego lub wysokiego stężenia DNA, obecności cichego genu u matki, nieudanej ekstrakcji lub braku wyniku serologicznego płodu. We wszystkich pozostałych przypadkach genotyp *RHD* płodu pokrywał się z genotypem dziecka, w jednym status D płodu był niezgodny z fenotypem RhD noworodka z powodu występowania u niego genu *RHD* nieulegającego ekspresji.

Nowością w dziedzinie nieinwazyjnych badań płodu było doniesienie holenderskie na temat udanego genotypowania antygeny płytkowego z układu HPA1 u 34 ciężarnych kobiet HPA1a-ujemnych [8]. W przypadku oznaczania różnic jednonukleotydowych w DNA z osocza matki przy zastosowaniu technologii *real-time* PCR napotymano na problem niespecyficznego amplifikacji matczynej allelu, kodującego swoistość antygenową HPA1b, co skutkowało fałszywie dodatnim wynikiem dla allelu kodującego antygen HPA1a płodu. Kolejne próby użycia modyfikowanych starterów ze sztucznie wprowadzonym błędem czy starterów z modyfikacją LNA (*locked nucleic acids*) lub PNA (*peptide nucleic acids*) prowadziły do poprawy swoistości metody, lecz wciąż nie wyeliminowały całkowicie problemu. Zastosowanie enzymu restrykcyjnego (*Msp1*) rozpoznającego sekwencję CCGG specyficzną dla allelu kodującego swoistość HPA1b — obecnego u matki, pozwoliło istotnie obniżyć poziom niespecyficznego amplifikacji. W osoczu 28 kobiet wykryto allel kodujący antygen HPA1a pochodzący od płodu, co było zgodne z genotypem urodzonych dzieci. U kobiet, które urodziły HPA1a-ujemne dzieci, w 3 przypadkach allelu „a” nie wykryto w żadnym z 3 powtórzeń reakcji, a u 3 pozostałych badanych uzyskano fałszywy sygnał amplifikacji w pojedynczej reakcji.

W ramach sesji plakatowej zaprezentowano ciekawą pracę na temat walidacji pierwszego zestawu komercyjnego do diagnostyki *RHD* płodu (Free DNA Fetal Kit® *RHD*) techniką *real-time* PCR wyprodukowanego we Francji [9]. Autorzy ocenili przydatność testu dla 30 próbek DNA z osocza ciężarnych izolowanych równolegle 3 metodami (QIA-amp DSP Virus Kit, Qiagen; MagNaPure, Roche; EasyMag, BioMerieux), w których eksony 5, 7,

10 genu *RHD* amplifikowano na aparatach LightCycler 1.5 oraz CFX 96. Uzyskane przez autorów wyniki potwierdziły możliwość szerokiego wykorzystania testu na różnych platformach aparaturowych, jakimi standardowo dysponują pracownie biologii molekularnej.

Podsumowując zaprezentowane na Kongresie materiały, ciągły rozwój technologiczny pozwala na wprowadzenie coraz czulszych i bardziej specyficznych narzędzi do oznaczania genów płodu z osocza ciężarnych i rozszerzanie panelu dostępnych rutynowo badań oraz ich pełną automatyzację. Wciąż najistotniejszymi zadaniami są opracowanie uniwersalnej i prostej kontroli obecności DNA płodu dla wyniku ujemnego i pełna standaryzacja procesu. Należy także pamiętać, że w badaniu występuje wysoki odsetek przypadków, których nie można interpretować z przyczyn uwarunkowań genetycznych, lub należy wykonywać ponownie oznaczenie z powodów technicznych, braku kontroli materiału płodowego, rozbieżnych wyników pochodzących ze śladowych zanieczyszczeń dodatnim materiałem lub wieku ciąży.

Piśmiennictwo

1. Legler J. Prenatal Rh testing. *Vox Sang.* 2010; 99 (supl. 1): 1.
2. de Haas M., Scheffer P., van der Schoot E. i wsp. Non-invasive fetal blood group genotyping with DNA from maternal plasma a seven-year clinical experience. *Vox Sang.* 2010; 99 (supl. 1): 24.
3. Doescher A., Muller T., Petershofen K., Wagner F. Evaluation of 26 single nucleotide polymorphisms as internal controls in prenatal diagnosis of fetal blood groups. *Vox Sang.* 2010; 99 (supl. 1): 24.
4. Orzińska A., Guz K., Kopec I., Michalewska B., Nowaczek-Migas M., Brojer E. Non-invasive fetal blood group genotyping: the decade of Polish experience. *Vox Sang.* 2010; 99 (supl. 1): 24.
5. Da Silva N., Oudin O., Saulet P. i wsp. Blood group genotype in determination of fetomaternal red blood cells incompatibility status: experience of the French National Center for Perinatal Hemobiology. *Vox Sang.* 2010; 99 (supl. 1): 25.
6. Amaral D., Castilho L. Fetal *RHD* genotyping by analysis of maternal plasma in a mixed population. *Vox Sang.* 2010; 99 (supl. 1): 25.
7. 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.
8. Scheffer P., de Haas M., Oepkes D., Ait Soussan 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.
9. Rouillac-Le Sciello C., De Beaumont C., Velard C. i wsp. Non-invasive fetal *RHD* genotyping from maternal plasma: validation of the Free DNA Fetal Kit® *RHD* using the CFX96 real-time system. *Vox Sang.* 2010; 99 (supl. 1): 404.