

Wybrane zagadnienia dotyczące nieinwazyjnych badań antygenów krwinkowych płodu w świetle doniesień prezentowanych na XXXIII Światowym Zjeździe Międzynarodowego Towarzystwa Przetaczania Krwi w Seulu (Korea Południowa)

The latest news about non-invasive fetal blood antigen typing presented during the 33rd International Congress of the International Society of Blood Transfusion in Seoul (South Korea)

Agnieszka Orzińska

Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

W dniach 30.05–04.06 2014 roku w Seulu w Korei Południowej odbył się XXXIII Międzynarodowy Zjazd Międzynarodowego Towarzystwa Przetaczania Krwi (ISBT, *International Society of Blood Transfusion*). Jednym z zagadnień poruszanych na zjeździe były najnowsze osiągnięcia w badaniach nieinwazyjnych antygenów krwinek płodu opartych na analizie materiału genetycznego pochodzącego z apoptozy łożyska, znajdującego się w krwiobiegu kobiet ciężarnych (tzw. wolnokrążące cząsteczki kwasów nukleinowych).

Zagadnienie to było tematem przewodnim sesji plenarnej Towarzystwa (*Presidential Award Session*), podczas której profesor Denis Lo — odkrywca kwasu deoksyrybonukleinowego płodowego w osoczu matki (cffDNA, *cell-free fetal deoxyribonucleic acid*) i twórca dziedziny nieinwazyjnych badań płodu — został uhonorowany nagrodą prezydenta ISBT. Sesję otwierał wykład *laudatum* profesora Mayra z Austrii, opisujący osiągnięcia laureata nagrody na polu badań nad wolnokrążącym DNA wykrywanym w osoczu pacjentów z chorobą nowotworową i u kobiet ciężarnych. W kolejnych wykładach zaprezentowano nieinwazyjne badania prenatalne oparte na tym materiale genetycznym

dziecka, wprowadzone do diagnostyki i powszechnie stosowane obecnie w opiece nad ciężarną. Profesor Ellen van der Schoot przedstawiła prowadzoną w Holandii nieinwazyjną diagnostykę antygenów erytrocytarnych i płytkowych płodu w przypadku ciąż zagrożonych wystąpieniem konfliktu serologicznego u kobiet z wykrytymi przeciwciałami. Opisała szczegółowo protokół badań i algorytm interpretacji obecności lub braku alleli kodujących antygeny, do których skierowane były przeciwciała matki. Dla potwierdzenia poprawności wyniku negatywnego pod względem analizowanego antygeny stosowano zestaw primerów i sond dla polimorfizmów typu insercja/delecja oraz genu *SRY* różnicujące rodziców. Badania wykonano u 362 zimmunizowanych kobiet ciężarnych, stosując technikę reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (*real-time PCR, real-time polymerase chain reaction*). W 97% przebadanych próbek konkluzywne wyniki uzyskano w ciągu 2–4 dni od pobrania materiału; w 4/362 przypadki badanie wymagało powtórzenia. Profesor van der Schoot podkreśliła, że w badaniach nadal brakuje uniwersalnej kontroli wyniku negatywnego, a stosowane w Holandii polimorfizmy typu inser-

Adres do korespondencji: dr n. biol. Agnieszka Orzińska, Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Chocimska 5, 00–975 Warszawa, tel.: 22 349 66 37, faks: 22 349 66 14, e-mail: aorzinska@ihit.waw.pl

cja/delecja oraz gen *SRY* różnicujące rodziców pozwalają potwierdzić obecność DNA płodowego tylko w 95% przypadków. W badanej grupie w 7 przypadkach nie potwierdzono obecności DNA płodowego w próbce negatywnej pod względem szukanego antygenu. W 212 przypadkach dostępny był wynik serologii krwi pępowinowej od dziecka i badacze wykazali jego 100-procentową zgodność z wynikami otrzymanymi z osocza matki przed porodem (w tym także dla 7 przypadków bez markera kontrolnego). Prelegentka podsumowała ten fragment wykładu stwierdzeniem, że ze względu na wysoką wiarygodność badań antygenów krwinek opartych na DNA płodowym pochodzącym z osocza kobiet zimmunizowanych badania z inwazyjnie pobranego materiału powinny zostać zaniechane. Równocześnie podkreśliła, iż badania zmian jednonukleotydowych, leżących u podstaw genotypowania antygenów z układów Kell lub HPA-1 powszechnie dostępną w laboratoriach genetycznych techniką *real-time* PCR, związane są z uzyskiwaniem wyników fałszywie pozytywnych pochodzących z niespecyficznego amplifikacji materiału matki i protokoły do tych badań wymagają dodatkowych modyfikacji dla zapewnienia odpowiedniej wiarygodności badania tych cech płodu.

W drugiej części wykładu profesor przedstawiła wyniki badań, których celem była ocena pierwszych 15 miesięcy funkcjonowania w Holandii narodowego programu powszechnych badań genotypu *RHD* płodu u RhD-ujemnych kobiet w 27. tygodniu ciąży w celu wykluczenia ciężarnej z programu immunoprofilaktyki śródciażowej ze względu na *RHD*-negatywny status płodu. Program ten realizowany jest przez jedno laboratorium Sanquin w Amsterdamie od połowy 2011 roku i ma na celu ograniczenie immunoprofilaktyki śródciażowej immunoglobuliną anti-D tylko do kobiet RhD-ujemnych noszących faktycznie płód RhD-dodatni. Genotyp płodu określany jest na podstawie badania DNA płodowego uzyskanego z krwi matki. Badacze holenderscy poszukują w reakcji *real-time* PCR dwóch fragmentów genu *RHD* w materiale genetycznym wyizolowanym z 1 ml osocza RhD-ujemnej kobiety ciężarnej. Ponieważ osoby RhD-ujemne rasy kaukaskiej nie posiadają genu *RHD*, jego wykrycie w materiale matki oznacza, że pochodzi on od płodu RhD-dodatniego i wtedy ciężarną kwalifikuje się do podania immunoglobuliny. Wynik przeciwny — brak amplifikacji genu *RHD* — jest interpretowany jako noszenie przez ciężarną płodu RhD-ujemnego, zgodnego z matką. To wyklucza wystąpienie konfliktu se-

rologicznego w tej ciąży i umożliwia zaniechanie profilaktyki w trakcie ciąży. Wszystkie etapy badania zostały zautomatyzowane, od wejścia zakodowanej próbki krwi ciężarnej do systemu laboratoryjnego przez oddzielenie osocza za pomocą stacji pipetującej *Xiril AG* (Hombrechtikon), automatyczną ekstrakcję DNA przez urządzenie *MagNa Pure 96* (Roche), nakapanie składników reakcji na stacji *Xiril* aż po program komputerowy interpretujący wynik amplifikacji genu *RHD* jako: pozytywny, negatywny lub do powtórzenia. To ogromne logistyczne przedsięwzięcie było możliwe dzięki zcentralizowaniu badań z całego kraju w jednym laboratorium dostosowanym do prowadzenia badań o wysokiej przepustowości. W czasie programu przebadano 32 222 próbek osocza w 883 badaniach (27 000 rocznie). Jako standard do oceny czułości testu stosowano pule osocz od 10 RhD-ujemnych ciężarnych o znanym statusie Rh płodu. W celu oceny wiarygodności badania wyniki genetyczne porównano z wynikami serologicznymi z krwi pępowinowej 25 789 dzieci. W 99,09% wyników prawidłowo określono obecność lub brak antygenu D u płodu. Uzyskano 9 wyników fałszywie *RHD*-ujemnych oraz 225 fałszywie *RHD*-dodatnich (którym zalecono podanie preparatu Ig). Jako przyczynę wyników fałszywie ujemnych badacze wskazali bardzo niskie stężenie DNA w 7 testowanych próbkach oraz błąd techniczny w pozostałych dwóch. Opisane badania pozwoliły wykluczyć z programu immunoprofilaktyki śródciażowej 38% przebadanych kobiet ciężarnych noszących RhD-ujemne dzieci.

W kolejnym wykładzie profesor Maria New z USA przedstawiła nieinwazyjną diagnostykę wrodzonego przerostu nadnerczy (CAH, *congenital adrenal hyperplasia*) — monogenowej choroby dziedzicznej, rozwijającej się u dziewczynek w trakcie życia płodowego [1]. Profesor Lo wraz z prelegentką wprowadzili z sukcesem nowoczesną nieinwazyjną diagnostykę prenatalną tej choroby opartą na materiale płodowym krążącym w krwiobiegu matki. W pierwszym etapie w 7. tygodniu ciąży przeprowadza się badanie obecności genu *SRY* z chromosomu Y w cffDNA wyizolowanym z osocza matek. To pozwala wykluczyć płody płci męskiej z niepotrzebnego leczenia farmakologicznego. Drugim etapem badań jest analiza DNA płodowego pod kątem obecności mutacji genu *CYP21A2*, determinującej defekt enzymu 21-hydroksylazy w szlaku przemian metabolicznych hormonów steroidowych nadnerczy. Próbkę osocza pobrane od ciężarnych noszących dziewczynki, wysyłane są z USA do laboratorium w Hongkon-

gu, gdzie badane są w ciągu kilku dni przy użyciu metody sekwencjonowania następnej generacji (NGS, *next generation sequencing*). Ta najnowsza technologia pozwala na uzyskanie wiarygodnych wyników w badaniach dotyczących zmian pojedynczych nukleotydów w materiale genetycznym płodu, wyizolowanym z osocza matki w tak wczesnej ciąży, i podjęcie leczenia już w 9. tygodniu ciąży tylko płodów noszących genetyczne obciążenie. Jak do tej pory statystycznie na 8 leczonych farmakologicznie płodów w 7 przypadkach dzieci leczone były niepotrzebnie, bo nie były dotknięte tą chorobą. Odkrycie profesora Lo i opracowanie nieinwazyjnego badania zmieniło całkowicie obowiązujące dotąd standardy postępowania w zapobieganiu tej chorobie. Prelegentka wskazała na ogromne możliwości wykorzystania nieinwazyjnej diagnostyki w przyszłości w przewidywaniu innych chorób monogenowych z równoczesną koniecznością opracowywania dotyczących ich standardów etycznych.

Ostatni wykład wygłosił sam uhonorowany [2], który przedstawił pokrótce kierunki rozwoju badań nieinwazyjnych po 2008 roku, kiedy to po raz pierwszy DNA płodowe z osocza posłużyło do zbadania całego genomu płodu dzięki zastosowaniu nowoczesnej techniki NGS. Technika ta umożliwia tak wysokie zwielokrotnienie sekwencji docelowej, że możliwe staje się wykrycie różnic jednonukleotydowych lub porównanie udziału ilości danego fragmentu materiału genetycznego od płodu o różnej ploidalności. Opracowane przez profesora i jego zespół algorytmy obliczania ilościowych zmian wykrytych fragmentów DNA płodowego umożliwiły przewidywanie ryzyka wystąpienia aneuploidii płodu. Obecnie badanie aneuploidalności chromosomów 21, 18 i 13 jest już wprowadzone w wielu krajach jako usługa diagnostyczna mająca status badania przesiewowego, zalecanego przed badaniem inwazyjnym. Profesor zaprezentował opracowaną przez swój zespół prenatalną diagnostykę aneuploidii opartą na technice PCR cyfrowego (*digital PCR*, *digital polymerase chain reaction*), polegającej na zliczaniu pojedynczych powielonych cząsteczek. Technika ta znajduje także zastosowanie w wykrywaniu polimorfizmów dotyczących pojedynczego nukleotydu w materiale dziecka. Prelegent zaprezentował wyniki swoich badań nad wielkością fragmentów wolnokrążącego DNA płodu w porównaniu do matczynego DNA krążącego w osoczu, gdzie wykrył różnicę w ilości wykrywanych fragmentów pochodzenia płodowego (głównie frakcja o wielkości 143 par zasad) a matczynego (głównie 166 par

zasad). Na podstawie stosunku wielkości krótszych i dłuższych fragmentów wykrywanych w osoczu ciężarnej zespół opracował algorytmy przewidywania aneuploidii płodu i prosty sposób obliczania procentowego udziału DNA płodowego w badanej próbce. Prelegent przedstawił także możliwość badań DNA płodowego na poziomie całego epigenomu. Różnica między niskometylowanym materiałem genetycznym pochodzącym z łożyska, a wysokometylowanym DNA matczynym pozwala na rozróżnienie materiału w osoczu i nieinwazyjne monitorowanie statusu epigenomicznego płodu. Badacze wykryli korelację poziomu metylacji określonych regionów wolnokrążącego DNA płodu z występowaniem cukrzycy ciążowej, zapłodnieniem *in vitro* lub paleniem w ciąży. Według wykładowcy to właśnie ta cecha daje możliwość opracowania najbardziej wiarygodnej metody przewidywania trisomii 21 i innych patologii. Na koniec profesor opisał swoje plany, jak powrót do diagnostyki chorób onkologicznych opartej na wykrywaniu w osoczu pacjentów wolnokrążącego DNA pochodzenia nowotworowego i określaniu poziomu metylacji poszczególnych regionów.

Temat nieinwazyjnego badania antygenów erytrocytarnych płodu omawiany był także na wykładach w czasie dwóch innych sesji zatytułowanych *Workshop Party-RBC Antigen Terminology* oraz *Immunobiology of Blood Cells — Blood Group Genotyping*. Podczas pierwszej sesji profesor Frederick Clausen z Danii zaprezentował doniesienie na temat możliwości przewidywania patologii, takich jak stan przedrzucawkowy (preeklampsja), dzięki analizie ilościowej wolno krążącego DNA płodowego w krwiobiegu matki z wykorzystaniem techniki *real-time* PCR. Praca została wykonana w grupie ciężarnych RhD-ujemnych noszących RHD-dodatni płód, które brały udział w narodowym, duńskim programie powszechnych badań kwalifikujących do immunoprofilaktyki śródciążowej. Poziom cffDNA mierzono ilością wykrytych ekwiwalentów genomowych genu *RHD* w grupie ciężarnych z obciążonym wywiadem (38 przypadków) i kontrolnej (982 przypadki). Porównując ilości wykrytego materiału płodowego w obu grupach, badacze ustalili statystycznie istotne zależności występowania choroby od podwyższonego stężenia materiału płodu wykrytego w osoczu matki. W podsumowaniu wskazali na możliwość dołączenia w przyszłości tego badania do panelu badań innych markerów, których poziom obecnie służy do oceny ryzyka wystąpienia preeklampsji.

Dodatkowe aspekty dotyczące diagnostyki nieinwazyjnej antygeny RhD płodu zaprezentowa-

wał zespół badaczy holenderskich podczas sesji *Blood Group Genotyping*. W doniesieniu pt.: „Czy chimeryzm łożyska może dawać wyniki fałszywie dodatnie w nieinwazyjnej metodzie genotypowania antygenów grup krwi płodu?” zespół przedstawił szczegółową analizę wyników fałszywie *RHD*-dodatnich otrzymanych w badaniach, które omówiono wcześniej na sesji plenarnej Towarzystwa [3]. Autorzy przeanalizowali dokładnie 255 wyników fałszywie *RHD*-dodatnich, co dotyczyło 0,87% przebadanych kobiet ciężarnych, którym zalecono niepotrzebne podanie immunoglobuliny. W 100 przypadkach (na 255) wykryto w materiale genomowym matki lub dziecka wariant genu *RHD* nieulegający ekspresji lub błędnie określony serologicznie u dziecka jako RhD-ujemny; w 71 przypadkach fałszywy wynik *RHD*-dodatni został wygenerowany automatycznie przez program komputerowy na podstawie niespecyficznego amplifikacji w 3 lub 4 reakcjach na 6 powtórzeń, a w 4 przypadkach stwierdzono zanieczyszczenie w próbkach krwi pępowinowej od noworodków RhD-ujemnych. W pozostałych przypadkach, jeśli był dostępny materiał, przeprowadzono dalsze badania. W celu potwierdzenia pokrewieństwa 23 próbki DNA matek i krwi pępowinowej przebadano techniką badania polimorfizmów krótkich powtórzeń tandemowych (STR, *short tandem repeats*) i stwierdzono, że w 5 przypadkach przysłano zamiast krwi pępowinowej dziecka materiał matki, a w jednym nie było żadnego pokrewieństwa. Ponowne badania zarchiwizowanych próbek osocza od 28/44 kobiet w 14 przypadkach dały powtórnie wynik *RHD*-dodatni, przy czym w 8 przypadkach wykryto także gen z chromosomu Y, a badanie z krwi pępowinowej w 4 przypadkach nie potwierdziło obecności tego genu u urodzonego dziecka. Jako przyczynę wyników fałszywie dodatnich badacze wskazali zjawisko mikrochimeryzmu łożyska, który powstaje w wyniku zaniknięcia na wczesnym etapie ciąży drugiego płodu — bliźniaka (*vanishing twin*). Na podstawie własnych wyników częstość tego zjawiska oceniono na 0,6%. Badacze podkreślili, że jeżeli ich wniosek i szacunek jest prawidłowy, to w diagnostyce opartej na badaniu DNA płodu występującego w osoczu matki, a dotyczącej patologii, takich jak trisomia 21, 18 czy 13, lub ciężarnych z przeciwciałami do antygenów komórek krwi, należy się liczyć z uzyskaniem wyniku fałszywie pozytywnego, zwłaszcza we wczesnych etapach ciąży.

W ostatnim wykładzie tej sesji wygłoszonym przez profesor van der Schoot pt.: „Aspekty

techniczne w pełni zautomatyzowanego programu powszechnych badań genu *RHD* płodu prowadzonych w Holandii” zaprezentowano szczegóły techniczne badań statusu RhD płodu z osocza kobiet ciężarnych RhD-ujemnych w celu wykluczenia z immunoprofilaktyki śródciażowej ciężarnych noszących RhD-ujemne dzieci [4]. Opisano dokładnie procedurę badania prezentowanego wcześniej na sesji plenarnej. Szczególną uwagę zwracano na wymagania dotyczące próbek pobieranych od ciężarnych. próbki krwi od matki (co najmniej 9 ml) pobierane są w 26.–30. tygodniu ciąży i transportowane do laboratorium do 5 dni. Zarówno faza przedanalizyczna, jak i analityczna badania jest w pełni zautomatyzowana, aby zminimalizować ryzyko błędu ludzkiego czy kontaminacji. W 833 cyklach przebadano 32 222 próbki osocza, z czego 21 powtórzono z powodu technicznych awarii robotów pipetujących lub niewłaściwych wartości referencyjnych standardu. Specjalne oprogramowanie umożliwia automatyczną analizę wyników amplifikacji dla 6 powtórzeń i generację końcowego wyniku *RHD*-dodatniego lub -ujemnego płodu oraz wystawienie formularza sprawozdania z badania wysyłanego do pacjentki z komentarzem o konieczności podania lub zaniechaniu iniekcji immunoglobuliny anty-D ze względu na wykryty genotyp *RHD* dziecka. Przez 15 miesięcy trwania programu osoba nadzorująca i autoryzująca wyniki elektroniczne zidentyfikowała jeden wynik fałszywie pozytywny. W podsumowaniu badacze podkreślili, że taka autoryzacja nie jest opłacalna finansowo i w przyszłości może być zaniechana, podobnie jak wszelkie powtarzanie wyników rozbieżnych, w których przypadku należy zalecić podanie immunoglobuliny anty-D.

Podsumowując, wykrycie wolnego pozakomórkowego DNA płodowego oraz dynamiczny rozwój wysokoczułych metod biologii molekularnej pozwoliły na znaczny postęp w określaniu ryzyka wystąpienia patologii w ciąży i objęcie immunoprofilaktyką lub leczeniem właściwą grupę ciężarnych. Powszechnie stosowana w laboratoriach genetycznych technika *real-time* PCR wraz z pełną komputeryzacją procesu badania sprawdziła się w narodowych programach badania genu *RHD* płodu w celu kwalifikacji kobiet RhD-ujemnych do śródciażowej immunoprofilaktyki, a najnowsze techniki NGS i digital PCR pozwalają na pokonanie ograniczeń metodycznych w badaniach DNA płodowego krążącego w krwiobiegu ciężarnej. Nieinwazyjne badania przy użyciu tych nowoczesnych technik wymagają jednak dalszej pełnej walidacji.

Piśmiennictwo

1. New M.I. Noninvasive prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia using cell-free fetal DNA in the maternal plasma. *Vox Sang.* 2014; 107 (supl. 1): 22.
2. Lo Y.M.D. Non-invasive prenatal testing: bringing genomic advances into the clinic. *Vox Sang.* 2014; 107 (supl. 1): 22–23.
3. Thurik F.F, Ait Soussan A., Woortmeijer H., Veldhuisen B., van der Schoot C.E., de Haas M. Technical performance of the fully automated fetal *RHD* screening program in the Netherlands. *Vox Sang.* 2014; 107 (supl. 1): 38.
4. van der Schoot C., Thurik F, Ait Soussan A., Woortmeijer H., Page-Christiaens G.C.M.L., de Haas M. Can chimerism cause false positive results in noninvasive blood group genotyping? *Vox Sang.* 2014; 107 (supl. 1): 38.