

Wybrane zagadnienia na temat aktualnego stanu nieinwazyjnej diagnostyki grup krwi płodu

w świetle doniesień prezentowanych na III Międzynarodowym Spotkaniu o Wolnokrążącym DNA

The current state of non-invasive diagnostics of fetal blood groups (selected issues in the context of reports presented at the Third International Meeting of Cell-free DNA)

Agnieszka Orzińska

Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej

Streszczenie

Nieinwazyjna diagnostyka prenatalna grup krwi oparta na pozakomórkowym DNA płodowym wolnokrążącym w krwioobiegu ciężarnej jest nowym badaniem wciąż udoskonalanym wraz z rozwojem wiedzy i rozwiązań technologicznych. Najistotniejszą rolę odgrywają badania dotyczące niezgodności matczyno-płodowej w zakresie antygenu RhD z układu Rh: u kobiet RhD ujemnych zimmunizowanych wynik badania obecności genu RHD płodu pozwala przewidzieć ryzyko choroby hemolitycznej płodu i noworodka, a u kobiet bez przeciwciał anti-D jest podstawą do rekomendacji immunoprofilaktyki śródciażowej. W niniejszej pracy omówiono wybrane zagadnienia na temat aktualnego stanu nieinwazyjnej diagnostyki grup krwi płodu w kontekście doniesień prezentowanych na III Międzynarodowym Spotkaniu o Wolnokrążącym DNA.

Słowa kluczowe: nieinwazyjna diagnostyka płodu, konflikt Rh, immunoprofilaktyka śródciażowa

J. Transf. Med. 2018; 11: 29–32

Summary

Non-invasive prenatal diagnostics of blood groups based on cell-free fetal DNA circulating in the bloodstream of pregnant women is a new test still improved according to the development of knowledge and technological solutions. The feto-maternal incompatibility in the RhD antigen from the Rh system is the most important part of the non-invasive diagnostics: in the case of immunized RhD-negative women the result of the presence of fetal RHD gene allows to predict the risk of hemolytic disease of the fetus and newborn, and in the case of women without anti-D antibodies — to recommend an antenatal immunoprophylaxis. This paper discusses selected issues on the current state of non-invasive diagnostics of fetal blood groups in the context of reports presented at the Third International Meeting of Cell-free DNA.

Key words: non-invasive prenatal diagnostics, RhD antigen, antenatal immunoprophylaxis

J. Transf. Med. 2018; 11: 29–32

Diagnostyka prenatalna grup krwi oparta na materiale genetycznym płodu krążącym w krwioobiegu kobiety ciężarnej jest jedną z najmłodszych dziedzin badań upowszechnionych w ostatnich latach, wciąż udoskonalanych i poszerzanych wraz z rozwojem wiedzy podstawowej w dziedzinach immunohematologii, badań nad wolnokrążącym materiałem genetycznym i postęпами technologii molekularnych [1–4].

Nieinwazyjne badania prenatalne (NIPT, *non-invasive prenatal testing*) dotyczące konfliktów matczyno-płodowych są prowadzone od 2000 roku i do rutynowych oznaczeń alleli kodujących antygen płodu wykorzystuje się głównie technikę *real-time* PCR. Badania przede wszystkim oparte są na protokołach typu *home-made*, a program zewnętrznej kontroli jakości (EQC) dostępny jest jedynie dla nieinwazyjnej diagnostyki antygeny RhD płodu kodowanego przez gen *RHD*. Nie wszystkie antygeny, spośród 352 obecnie poznanych, prowadzą do konfliktów matczyno-płodowych. Najistotniejszą rolę odgrywają badania antygeny RhD płodu z osocza ciężarnych RhD ujemnych. Celem nieinwazyjnej diagnostyki obecności genu *RHD* płodu są z jednej strony badania prowadzone u kobiet z przeciwciałami anti-D, pozwalające przewidzieć ryzyko choroby hemolitycznej płodu/novorodka, natomiast z drugiej strony badania kobiet RhD ujemnych niezimmunizowanych w celu rekomendacji immunoprofilaktyki śródciażowej wprowadzone powszechnie w wielu krajach [5–8]. Bezspornie największą korzyścią NIPT u ciężarnych zimmunizowanych jest prawie całkowite zaprzestanie diagnostyki inwazyjnej *RHD* płodu poprzez amniopunkcję. Z badań duńskich, zaprezentowanych na *3rd International Meeting of Cell-free DNA*, 6–7.04.2017 roku w Kopenhadze, wynika, że po wprowadzeniu w 2010 roku programu śródciażowej profilaktyki konfliktu Rh, w którym do kwalifikacji kobiet stosowano badania nieinwazyjne *RHD* płodu, w ciągu 4 lat zaobserwowano istotny statystycznie spadek liczby kobiet ciężarnych zimmunizowanych. Dzięki badaniom *RHD* płodu 97% kobiet z dzieckiem zgodnym, czyli Rh-ujemnym, uniknęło niepotrzebnego podania preparatu Ig anti-D. W programie duńskim badania *RHD* płodu były na tyle wiarygodne, że w 2015 roku Dania zaprzestała także badań RhD dziecka po urodzeniu. Z zestawienia opublikowanych wyników z wysokoprzepustowych badań screeningowych *RHD* płodu, stosowanych obecnie rutynowo albo będących w fazie wdrożenia w krajach europejskich, wynika, iż czułość testów NIPT *RHD* waha się w zakresie 99,6–100%, a w I trymestrze ciąży wynosi 98,9–99,3%. Podobne wartości

99,99% czułości i 99,81% specyficzności uzyskali badacze fińscy w 2-letnim programie prowadzonym u 10 814 kobiet [7]. Z kolei w ostatnich badaniach holenderskich prowadzonych w grupie 25 789 kobiet uzyskano 9 wyników fałszywie *RHD*-ujemnych płodu z osocza matki, ale także wykazano fałszywie Rh-ujemne wyniki serologiczne u trojga noworodków, skutkujące niepodaniem preparatu anti-D po porodzie, co stawia wiarygodność badania genetycznego na poziomie oznaczeń serologicznych [6].

Od 2 lat ośrodek w Danii organizuje zewnętrzną kontrolę jakości (EQC) dla nieinwazyjnej diagnostyki *RHD* płodu, w której rok temu wzięły udział 22 laboratoria z 15 krajów [9].

Tematem szeroko dyskutowanym od kilku lat jest oszczędność i efektywność wprowadzenia nieinwazyjnej diagnostyki *RHD* płodu do celowanej immunoprofilaktyki RhD jako powszechnego programu narodowego [10–11]. Z danych z Narodowego Instytutu Wdrożeniowego (NICE) w Wielkiej Brytanii wynika, iż obecnie ryzyko immunizacji anti-D, po zastosowaniu powszechnej immunoprofilaktyki śródciażowej i pourodzeniowej, u ciężarnych RhD ujemnych wynosi 0,3% (281 na 100 000 ciąży). Statystyka pokazuje, że 61,6% RhD ujemnych matek rodzi dzieci RhD dodatnie, a zatem w obecnie stosowanym schemacie opieki nad ciężarną 37 971 kobiet rocznie niepotrzebnie otrzymuje Ig anti-D. Podłoże genetyczne antygeny RhD u większości osób RhD ujemnych w Wielkiej Brytanii jest związane z całkowitą delecją genu *RHD*, a badanie NIPT jest w tym kraju dostępne od wielu lat dla indywidualnych pacjentek i możliwe do przełożenia na skalę o wysokiej przepustowości koniecznej dla badań screeningowych. Dla oceny wiarygodności testu do diagnostyki NIPT *RHD* NICE przeprowadził przegląd publikacji o badaniach screeningowych *RHD* płodu opublikowanych w latach 2011–2015. Przygotowano na ich podstawie scenariusze strategii postępowania przyjęte przez różnych badaczy i oceniano względem nich wiarygodność i koszty badania. Stwierdzono, że niezależnie od strategii, oszczędność wynosi 296 000–409 000 funtów rocznie względem obecnie stosowanej. Rezygnacja z badania grupy Rh u noworodka redukuje koszty, ale też i efektywność badania. Zużycie preparatu spada z 99% do 65,9%. Natomiast zastosowanie wyniku NIPT *RHD* jako wskazania do odstąpienia od przyjęcia preparatu spowoduje, że 1,2% kobiet nie otrzyma Ig anti-D versus 0,6% przy obecnie stosowanej uniwersalnej immunoprofilaktyce dla wszystkich kobiet RhD ujemnych. Według szacunków badaczy, jeśli grupa Rh noworodka jest badana po urodzeniu,

to zimmunizuje się 284 na 100 000 kobiet. Natomiast, jeśli wynik NIPT *RHD* jest także podstawą do podania preparatu po porodzie z pominięciem badań serologicznych noworodka, to zimmunizuje się 294 na 100 000 kobiet. W 2016 roku NICE opublikowało wytyczne dotyczące nieinwazyjnego testu *RHD* płodu dla organów decyzyjnych. Oceniło, że wysokoprzepustowe badanie kosztuje 24 funty, a oszczędność powinna być monitorowana w poszczególnych jednostkach, ponieważ zależy od przyjętej strategii postępowania. Standardowy schemat rekomendowany przez NICE zakłada wykonanie testu NIPT w 16. tygodniu ciąży i podanie 1 dawki Ig anti-D w 28. tygodniu tylko dla kobiet noszących RhD dodatni płód. W końcowym opracowaniu raportu autorzy podkreślają, że brakuje opublikowanych danych o ewentualnych kontaminacjach czy czynnikach zakaźnych w preparatach Ig anti-D, natomiast trzeba się liczyć z podwyższonym ryzykiem wyników fałszywie RhD dodatnich płodu w populacjach niejednorodnych etnicznie, co zmienia przedstawioną kalkulację.

Podobną analizę dostępnych danych na temat NIPT *RHD* oraz końcowe rekomendacje sformułowali badacze kanadyjscy, wskazując, że w przypadku Kanady model badań screeningowych w I trymestrze ciąży w powiązaniu z celowaną immunoprophylaktyką jest najbardziej optymalny do wprowadzenia do istniejącego obecnie programu opieki nad ciężarną Rh ujemną. W wytycznych autorzy określają, że ryzyko wyniku fałszywie *RHD* ujemnego płodu jest bardzo niskie, a korzyści z wczesnego określenia genotypu *RHD* płodu pozwalają zminimalizować ryzyko immunizacji dzięki zastosowaniu profilaktyki [12].

Zbliżoną kalkulację oszczędności z wprowadzenia powszechnych badań *RHD* płodu podają badania australijskie [13]. Koszt jednostkowy badania wyceniono na 63,40 AU\$. Wprowadzenie badania NIPT *RHD* jako kwalifikującego do podania preparatu anti-D spowodowałoby, że 14 000 kobiet RhD ujemnych rocznie uniknęłyby śródciążowego przyjęcia preparatu Ig anti-D, co daje to 2,1 mln AU\$ oszczędności. Dodatkowo z powodu zmniejszonego zużycia preparatu program szczepienia dawców RhD ujemnych zaoszczędziłby około 616 000 AU\$ rocznie.

Wysoki koszt jednostkowy badania *RHD* płodu, w którym główną składową jest cena etapu izolowania DNA z osocza, jest w wielu krajach przyczyną braku wprowadzenia tego testu jako powszechnie obowiązującego dla celowanej immunoprophylaktyki RhD. Ostatnio zespół z firmy brytyjskiej Nonacus zaprezentował nowatorski test diagnostyczny *Cell-3Direct: Rhesus D Fetal Blood Group Genotyping* do

diagnostyki *RHD* płodu. Test umożliwia wykonanie badania wprost z 80 μ l osocza ciężarnej RhD ujemnej (w 24.–26. tygodniu ciąży) z pominięciem etapu izolowania DNA, co skraca czas procedury do 3 godzin. W jednej turze badania bada się do 13 pacjentek. Zaprezentowane wyniki tego testu charakteryzowały się zarówno 100% czułością, jak i specyficznością przy 2% odsetku wyników niekonkluzywnych — wymagających powtórzenia badania [14].

W diagnostyce prenatalnej opartej na wolno-krażącym DNA płodowym istotnym zagadnieniem jest brak uniwersalnej kontroli obecności tego materiału w przypadku uzyskania wyniku ujemnego dla badanej cechy płodu. Szczególnie istotne jest to w powszechnie prowadzonych nieinwazyjnych badaniach *RHD* płodu dla celowanej immunoprophylaktyki RhD [9]. Zespół holenderski zaprezentował pracę dotyczącą wprowadzenia do testu wykrywającego *RHD* płodu kontroli wewnętrznej dla etapu izolowania i detekcji *real-time* PCR. Kontrola oparta jest na dodaniu do próbki badanego osocza syntetycznie uzyskanej sekwencji DNA z herpeswirusa typu 1 (PhHV-1) w określonym stężeniu i wykrywaniu tej sekwencji plazmidowej równoległe z sekwencją genu *RHD* w reakcji typu tripleks (eksyony 5, 7 genu *RHD* i PhHV1-gB) [15]. Badacze wykazali, że kontrola wewnętrzna pozwala wykryć wyniki fałszywie *RHD* negatywne z powodu niskiej jakości izolacji DNA lub obecności inhibitorów PCR w eluacie, a równocześnie nie zmniejsza efektywności samej izolacji cfDNA ani czułości amplifikacji genu płodu.

Dla prawidłowej interpretacji wyników genotypowania antygenów grup krwi na poziomie analizy DNA komórkowego i wolnokrażącego konieczne jest dokładne poznanie podłoża molekularnego występowania lub braku antygenów zarówno na poziomie polimorfizmów kodujących dane swoistości antygenowej, regulacji ekspresji genów, jak i budowy i interakcji cząsteczek noszących dane epitopy antygenowe. Nadal trwa proces uzupełniania baz alleli kodujących swoistości antygenowe. Na przykład prowadzone w ostatnich latach powszechne badania genu *RHD* płodu u tysięcy ciężarnych RhD ujemnych pozwoliły wykryć i opisać szereg nowych wariantów alleli tego genu [5–7]. Dzięki najnowszym technikom, takim jak *SNP-array-GWAS* (*single nucleotide polymorphism-array-genome wide association study*) czy sekwencjonowania następnej generacji WES (*whole exom sequencing*), ustalono podłoże genetyczne występowania lub braku istotnych z punktu widzenia konfliktu matczyno-płodowego antygenów, takich jak Jr^a kodowanego

przez gen *ABCG2* czy antygeny SARA w układzie MNS [16, 17]. Naukowcy z Uniwersytetu w Lund (w Szwecji) opublikowali bazę alleli kodujących antygeny krwinki czerwonej, w której umieszczono allele wykryte u 2500 osób badanych techniką WGS (*whole genome sequencing*), tzw. *Erythrobase Database* [18]. W referencyjnych źródłach badacze zidentyfikowali 19% wariantów spośród 1241 wariantów alleli wykrytych w grupie badanej. Wśród pozostałych nieznanymi wariantów stwierdzono, że 20% dotyczy glikozylotransferaz i prawdopodobnie zmiana w nich ma wpływ na aktywność lub specyficzność enzymatyczną, co powoduje ilościowe i jakościowe zmiany antygenów kodowanych przez te warianty. Wśród zsekwencjonowanych nieznanymi wariantów 36% ma zmienioną zewnętrzną część białka na krwince i powstaje pytanie, czy są to nieodkryte jeszcze antygeny o nieznanym jak dotąd immunogenności. Obecnie trwają prace grupy roboczej Międzynarodowego Towarzystwa Transfuzjologicznego (ISBT) nad ustaleniem jednolitych sekwencji referencyjnych alleli kodujących antygeny grup krwi (nazwa projektu LRG; locus *reference genome*) i powiązania ich z danymi fenotypowymi oraz charakterystyką serologiczną.

Podsumowując, wraz z upowszechnianiem się nieinwazyjnych badań aneuploidalności płodu nastąpił ogólny wzrost świadomości i wiedzy na temat badań opartych na cffDNA, a przez to także upowszechnienie diagnostyki nieinwazyjnej RHD płodu w kontekście celowanej immunoprofilaktyki ciężarnych RhD ujemnych. Nadal istotnymi przeszkodami na drodze wprowadzenia tego badania jako powszechnego programu narodowego są czynniki: ekonomiczny — czyli bilansowanie się oszczędności preparatu z ceną jednostkową badania oraz techniczny — brak uniwersalnej kontroli obecności DNA płodowego w osoczu matki. Postępujący rozwój wiedzy genetycznej na temat poszczególnych populacji i coraz czulszych metod badań umożliwia, poprzez analizę DNA wolnokrążącego w osoczu ciężarnej, przewidywanie fenotypu antygeny u płodu zagrożonego wystąpieniem konfliktu matczyno-płodowego po 10. tygodniu ciąży z blisko 100-procentową wiarygodnością.

Piśmiennictwo

- Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997; 350(9076): 485–487, doi: [10.1016/S0140-6736\(97\)02174-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)02174-0), indexed in Pubmed: [9274585](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9274585/).
- Orzińska A, Guz K, Dębska M, et al. 14 Years of Polish Experience in Non-Invasive Prenatal Blood Group Diagnosis. *Transfus Med Hemother*. 2015; 42(6): 361–364, doi: [10.1159/000440821](https://doi.org/10.1159/000440821), indexed in Pubmed: [26733766](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26733766/).
- Sillence KA, Roberts LA, Hollands HJ, et al. Fetal Sex and RHD Genotyping with Digital PCR Demonstrates Greater Sensitivity than Real-time PCR. *Clin Chem*. 2015; 61(11): 1399–1407, doi: [10.1373/clinchem.2015.239137](https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.239137), indexed in Pubmed: [26354802](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26354802/).
- Wienzek-Lischka S, Krautwurst A, Fröhner V, et al. Noninvasive fetal genotyping of human platelet antigen-1a using targeted massively parallel sequencing. *Transfusion*. 2015; 55(6 Pt 2): 1538–1544, doi: [10.1111/trf.13102](https://doi.org/10.1111/trf.13102), indexed in Pubmed: [25873286](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25873286/).
- Clausen FB, Christiansen M, Steffensen R, et al. Report of the first nationally implemented clinical routine screening for fetal RHD in D- pregnant women to ascertain the requirement for antenatal RhD prophylaxis. *Transfusion*. 2012; 52(4): 752–758, doi: [10.1111/j.1537-2995.2011.03362.x](https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03362.x), indexed in Pubmed: [21995641](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21995641/).
- Stegmann TC, Veldhuisen B, Bijman R, et al. Frequency and characterization of known and novel RHD variant alleles in 37 782 Dutch D-negative pregnant women. *Br J Haematol*. 2016; 173(3): 469–479, doi: [10.1111/bjh.13960](https://doi.org/10.1111/bjh.13960), indexed in Pubmed: [27018217](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27018217/).
- Haimila K, Sulín K, Kuosmanen M, et al. Targeted antenatal anti-D prophylaxis program for RhD-negative pregnant women - outcome of the first two years of a national program in Finland. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2017; 96(10): 1228–1233, doi: [10.1111/aogs.13191](https://doi.org/10.1111/aogs.13191), indexed in Pubmed: [28718198](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28718198/).
- de Haas M, Thurik FF, van der Ploeg CPB, et al. Sensitivity of fetal RHD screening for safe guidance of targeted anti-D immunoglobulin prophylaxis: prospective cohort study of a nationwide programme in the Netherlands. *BMJ*. 2016; 355: i5789, indexed in Pubmed: [27821701](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27821701/).
- Clausen FB, Barrett AN, Krog GR, et al. Non-invasive foetal RhD genotyping to guide anti-D prophylaxis: an external quality assurance workshop. *Blood Transfus*. 2017 [Epub ahead of print]: 1–5, doi: [10.2450/2017.0329-16](https://doi.org/10.2450/2017.0329-16), indexed in Pubmed: [28488977](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28488977/).
- Hawk AF, Chang EY, Shields SM, et al. Costs and clinical outcomes of noninvasive fetal RhD typing for targeted prophylaxis. *Obstet Gynecol*. 2013; 122(3): 579–585, doi: [10.1097/AOG.0b013e31829f8814](https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e31829f8814), indexed in Pubmed: [23921866](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23921866/).
- Teitelbaum L, Metcalfe A, Clarke G, et al. Costs and benefits of non-invasive fetal RhD determination. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015; 45(1): 84–88, doi: [10.1002/uog.14723](https://doi.org/10.1002/uog.14723), indexed in Pubmed: [25380024](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25380024/).
- Johnson JA, MacDonald K, Clarke G, et al. No. 343-Routine Non-invasive Prenatal Prediction of Fetal RHD Genotype in Canada: The Time is Here. *J Obstet Gynaecol Can*. 2017; 39(5): 366–373, doi: [10.1016/j.jogc.2016.12.006](https://doi.org/10.1016/j.jogc.2016.12.006), indexed in Pubmed: [28454757](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28454757/).
- Gordon LG, Hyland C, Hyett J, et al. Non-invasive fetal RHD genotyping of RhD negative pregnant women for targeted anti-D therapy in Australia: a cost-effectiveness analysis. *Prenat Diagn*. 2017 [Epub ahead of print], doi: [10.1002/pd.5176](https://doi.org/10.1002/pd.5176), indexed in Pubmed: [29096422](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29096422/). <https://nonacus.com/support/>.
- Javadi A, Veldhuisen B, de Ha, et al. Evaluation of porcine herpesvirus (PHHV) as an internal control for prenatal RHD genotyping in maternal plasma. *Vox Sang*. 2016; 111: 246.
- Zelinski T, Coghlan G, Liu XQ, et al. *ABCG2* null alleles define the Jr(a-) blood group phenotype. *Nat Genet*. 2012; 44(2): 131–132, doi: [10.1038/ng.1075](https://doi.org/10.1038/ng.1075), indexed in Pubmed: [22246507](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22246507/).
- McBean RS, Hyland CA, Hendry JL, et al. SARA: a „new” low-frequency MNS antigen (MNS47) provides further evidence of the extreme diversity of the MNS blood group system. *Transfusion*. 2015; 55(6 Pt 2): 1451–1456, doi: [10.1111/trf.12973](https://doi.org/10.1111/trf.12973), indexed in Pubmed: [25523184](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25523184/).
- Moller M, Joud M, Storry JR, et al. ErythroGene: a database for in-depth analysis of the extensive variation in 36 blood group systems in the 1000 Genomes Project. *Blood Advances*. 2016; 1(3): 240–249, doi: [10.1182/bloodadvances.2016001867](https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2016001867).