

# Antenatal bestemmelse af føtal RhD- blodtype baseret på føtalt DNA i plasma fra den RhD-negative mor – sekundærpublikation

Videnskabelig medarbejder Frederik Banch Clausen, bioanalytikerunderviser Grethe Risum Krog, læge Klaus Rieneck, videnskabelig medarbejder Leif Kofoed Nielsen, videnskabelig medarbejder Rasmus Lundquist, videnskabelig medarbejder Kirstin Finning, overlæge Ebbe Dickmeiss, overlæge Morten Hedegaard & overlæge Morten Hanefeld Dziegiel

H:S Rigshospitalet, H:S Blodbank, KI 2034 og Obstetrisk Afdeling, RH4031, og The International Blood Group Reference Laboratory (IBGRL), Bristol, England

## Resume

Immunisering mod rhesus D-blodtypeantigenet er den hyppigste årsag til hæmolytisk sygdom hos fostre og nyfødte (HDFN). Vi har etableret en test til antenatal bestemmelse af føtal RhD-blodtype på grundlag af føtalt DNA i maternelt plasma. Vi anvendte realtids-polymerasekædereaktion (*real time* PCR) baseret på påvisning af *RHD*-genets exon 7 og exon 10. Plasma fra 56 gravide RhD-negative kvinder i 15.-36. graviditetsuge blev analyseret. De genetiske resultater blev sammenlignet med RhD-blodtype bestemt serologisk efter fødslen. Forudsigelse af føtal RhD-blodtype baseret på tilstedeværelse af dele af *RHD*-genet var fra 16. gestationsuge 100% konkordant med serologisk blodtype.

Antistoffer hos moderen mod antigener fra rhesus (RH)-blodtypesystemet er den hyppigste årsag til hæmolytisk sygdom hos fostre og nyfødte (HDFN). RH-profylakse efter fødslen forhindrer immunisering mod RhD, men flere steder i udlandet anvendes profylakse tillige antenalt for yderligere at reducere forekomsten af immunisering [1]. Kendskab til den føtale RhD-blodtype ville betyde, at man kunne nøjes med at give antenatal profylakse til kvinder, der bærer et RhD-positivt foster. Statistisk er det kun 60% af de RhD-negative mødre, der bærer et RhD-positivt foster.

For de gravide kvinder, der på trods af profylakse alligevel er blevet immuniserede, vil tidligt kendskab til den føtale RhD-blodtype også være værdifuldt: Er fostret RhD-positivt iværksættes den nødvendige monitorering; er fostret derimod RhD-negativt kan man undgå unødige test og undgå at bekymre familien.

I forbindelse med antenatal profylakse skal fostrets RhD-blodtype kendes inden uge 28, mens fostrets RhD-blodtype hos immuniserede kvinder skal kendes så tidligt som muligt.

I 1997 blev det vist, at frit føtalt DNA cirkulerer i moderens plasma under graviditeten [2] og i øvrigt forsvinder på mindre end en time efter fødslen [3]. Siden da er der med udgangspunkt i denne kilde til føtalt materiale blevet udviklet ikke-invasive analyser til prædiktation af RhD-blodtype med detektionsstrategier gående fra påvisning af enkelte til multiple *RHD*-specifikke gensekvenser [1]. Påvisning af et *RHD*-gen hos et foster er dog ikke ensbetydende med, at fostret også får RhD-blodtypen, idet genet i sjældne tilfælde kan være til stede uden at give anledning til blodtypen.

Derfor er der tale om en forudsigelse og ikke en definitiv blodtypebestemmelse.

En sikker bestemmelse af et fosters RhD-blodtype har været vanskeliggjort af den sparsomme føtale DNA-mængde i maternelt plasma [4] – specielt i første trimester. Den føtale DNA-mængde stiger gradvist igennem graviditeten [4], så forudsigelsen er pålidelig i andet og tredje trimester.

Vores mål var at udvikle en sensitiv og præcis screentest for føtal *RHD*-genotype til brug ved antenatal profylakse. Vi designede et nyt primersæt, specifikt til realtids-polymerasekædereaktion (*real time* PCR) på ABI's 7500 Detection System, til påvisning af *RHD*-genets exon 7 i kombination med et publiceret primersæt til påvisning af exon 10 [5].

## Materiale og metoder

### Provemateriale

Blodprøverne blev indsamlet fra tre kohorter. Kohorte 1 var ikkegravide danske personer (n = 42). Kohorte 2 var RhD-negative gravide danske kvinder (n = 38) i 17.-36. graviditetsuge. Kohorte 3 var 18 gravide RhD-negative kvinder, hvorfra 21 anonymiserede plasmaprøver til validering blev leveret af The International Blood Group Reference Laboratory (IBGRL), Bristol, England. *RHD*-genotype og RhD-blodtype var ukendt af undersøgerne under analysen.

### Prøvebehandling

Blodprøver fra kohorte 2 blev opsamlet i 7 ml-ethylen-diamin-tetra-acetat (EDTA)-rør og opbevaret ved stuetemperatur indtil plasma blev separeret ved centrifugering i ti minutter ved 1.700 × g, og to portioner a 1 ml plasma blev overført til Eppendorf-rør, uden at celler blev taget med. Plasmaet blev umiddelbart frosset, og tiden fra prøvetagning til frysning var maksimalt 48 timer. Plasmaprøverne opbevarede ved -20 °C indtil DNA-oprensning og realtids-PCR-analyse blev foretaget.

## VIDENSKAB OG PRAKSIS | SEKUNDÆRPUBLIKATION

**DNA-oprensning fra buffy coat**

DNA blev oprenset fra *buffy coat* fra prøver fra kohorte 1 ved hjælp af QIAamp Blood Midi Kit (Qiagen Inc., Basel) efter protokollen for DNA Blood Midi Kit.

**DNA-oprensning fra maternelt plasma**

En volumen på 800 µl plasma blev processeret med QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen Inc.) efter protokollen Blood and Fluid Spin Protocol med mindre modifikationer. Prøverne blev testet umiddelbart efter oprensningen. Ved hver oprensningsserie inkluderedes en positiv kontrol bestående af plasma fra et RhD-positivt individ blandet med plasma fra et RhD-negativt individ i forholdet 1:5 eller 1:8.

**Realtids-PCR-analyse**

DNA-prøver blev testet ved brug af realtids-PCR ABI 7500 Detection System (Applied BioSystems, Foster City) med TaqMan kemi. Sekvenserne for oligoer anvendt til opformering af *RHD* exon 7 var følgende: *RHD*ex7s: 5'-CAG CTC CAT CAT GGG CTA CAA-3'; *RHD*ex7a: 5'-CCG GCT CCG ACG GTA TC-3'; *RHD*ex7p: 5'-FAM-CAG CAC AAT GTA GAT GAT CTC TCC AAG CAG-TAMRA-3'. Primer *RHD*ex7a var identisk med D7b-antisense [6]. Oligoer anvendt til opformering af *RHD* exon 10 var identiske med RD-A, RD-B og RD-T [5].

Amplifikationsreaktionerne med totalvolumen på 25 µl blev lavet med Universal Master mix (Applied BioSystems). *Template*-volumen var 5 µl, og den endelige primer og probe-koncentration var henholdsvis 900 nM og 100 nM. Hver prøve blev analyseret i fire replikater for hvert primer/probesæt - i alt otte reaktioner pr. person. Hver analyseopsætning indeholdt følgende kontroller: DNA fra en RhD-positiv, DNA fra en RhD-negativ og destilleret, sterilt H<sub>2</sub>O i stedet for template.

Den termiske PCR-profil var to minutter ved 50 °C og 10 minutter ved 95 °C, efterfulgt af 45 cykler a 95 °C i 15 sekunder og 60 °C i et minut.

Forudsigelse af RhD-positiv blodtype defineredes som mindst to positive af de fire replikater for hver exon. Forudsigelse af RhD-negativ blodtype defineredes som en eller ingen positive af fire replikater for hver exon. Udfald herimellem betragtedes som inkonklusive.

Data blev omregnet til DNA i picogram (pg) via en standard. DNA i pg blev omregnet til DNA-kopier ved at dividere med 7 pg/kopi.

**Resultater****Specificitet og sensitivitet**

DNA oprenset fra *buffy coat* fra 42 personer, der repræsenterende alle de hyppigste Rh-fænotyper, blev analyseret for at demonstrere, at vores oligoer var specifikke for *RHD*-detektion. Resultaterne, RhD-positiv (n = 22) og RhD- (n = 20), fra genotypebestemmelse var konkordante med serologisk RhD-

negativ blodtype med undtagelse af en prøve. En serologisk RhD-negativ prøve med sandsynlig genotype dCe/dCe blev genotypebestemt til at være *RHD*-positiv. Specificitet var derfor 94,7%, mens sensitivitet var 100%.

**Bestemmelse af føtal RhD-type i maternelt plasma**

Prøver fra 17.-36. graviditetsuge fra danske RhD-negative gravide kvinder blev analyseret. Der var 100% konkordans mellem forudsigelse af føtal RhD-type og postnatalt serologisk bestemt RhD-type, med RhD-positive (n = 24) og RhD-negative (n = 14) (Tabel 1).

Med valideringsprøverne fra IBGRL fra 15.-36. graviditetsuge var der 100% konkordans mellem forudsigelse af føtal RhD-type og den genotype og fænotype, der blev oplyst fra IBGRL (Tabel 1). En prøve blev dog bedømt som værende inkonklusiv, og RhD-type blev ikke forudsagt, da prøven var positiv i to ud af fire replikater med exon 7, men negativ med exon 10. Barnets prøve var RhD-positiv.

**Estimering af antallet af føtale RHD-genkopier pr. ml maternelt plasma**

Antallet af føtale *RHD*-genkopier pr. ml-plasma blev estimeret i alle *RHD*-positive prøver (n = 34) fra kohorte 2 og kohorte 3 ud fra en standard oprenset fra *buffy coat* fra et *RHD*-hemizygot individ. Disse resultater viste en stigning i medianen af antallet af DNA-kopier med stigende gestationsalder (Tabel 2).

Tabel 1. Forudsigelse af føtal RhD-type i maternelt plasma.

Graviditetsuge	Forudsigelse af RhD-type/ postnatal serologisk RhD-type, n		Konkordans, %
	positive	negative	
<i>Danske gravide kvinder</i>			
17-25	2/2	3/3	100
26-29	7/7	Ingen	100
34-36	15/15	11/11	100
<i>Prøver fra IBGRL</i>			
15 <sup>a</sup>	Inkonklusiv	-	-
15-24	6/6	8/8	100
25-36	4/4	2/2	100

IBGRL = The International Blood Group Reference Laboratory.

a) Denne prøve var inkonklusiv, og RhD-blodtype blev derfor ikke forudsagt.

Tabel 2. Antallet af føtale RHD-DNA-kopier<sup>a</sup> pr. ml maternelt plasma.

Graviditetsuge	Exon 7		Exon 10	
	median	interval	median	interval
16-21	30,7	19,3-56,6	32,7	13,6-82,8
24-31	56,1	22,5-341,5	63,8	25,4-263,2
34-35	121,3	29,6-623,8	86,2	13,9-434,8

a) Omregnet via 7 picogram DNA/DNA-kopi.

## Diskussion

Vi præsenterer her en genomisk RhD-blodtypningstest, som fra 16. gestationsuge er 100% konkordant med serologisk blodtypning af barnet efter fødslen. Vi brugte dele af exon 7 og exon 10 som *RHD*-specifikke gensekvenser. I en nyligt publiceret artikel af Rouillac-Le Sciellour *et al* påviste man en konkordans på 99,5% (eksklusive inkonklusive prøver), ved brug af *RHD*-exon 7 og *RHD*-exon 10 som specifikke gensekvenser [7].

Antallet af føtale *RHD*-DNA-kopier pr. ml maternelt plasma og den gradvise stigning i antallet af kopier i forhold til gestationsuge svarer til tidligere observationer [8]. Variationen i individuelle DNA-niveauer, f.eks. i intervallet 34.-35. graviditetsuge (Tabel 2), er for beskrevet ved studier af føtalt DNA [4, 5]. Denne variation kan tilskrives enten individuelle faktorer eller variation i udbytte fra DNA-oprensningen.

To plasmaprøver fra 15. graviditetsuge repræsenterede den laveste gestationsalder i vores studie. Den ene prøve blev bedømt som værende inkonklusiv i forhold til vores definitioner. Vi havde desværre ikke mulighed for at teste moderen igen senere i graviditeten. Den anden prøve blev korrekt forudsagt at være RhD-negativ.

RH-blodtypesystemet rummer adskillige genetiske varianter, hvilket er en udfordring for RH-genotypebestemmelse. Visse sjældent forekommende typer vil kun blive opformet i det ene af de to exoner i vores test. Hybridgener som *RHD-CE(7-9)-D* vil således blive defineret som inkonklusive. *RHD $\psi$*  detekteres med vores *setup*; DNU og D<sup>II</sup> har hver deres eneste punktmutation liggende i sekvensen for primeren for exon 7 og forventes ikke at blive detekteret som RhD-positiv.

I de indledende test af specificitet og sensitivitet bedømte vi en RhD-negativ person til at være RhD-positiv. Denne person er homozygot med den meget sjældne haplotype dCe (r) med frekvensen 0,0098. Vi har tidligere i vores laboratorium bestemt et individ med samme haplotype til at være *RHD*-positiv. Et studie af den molekylære baggrund for falske positive resultater hos europæere viste en frekvens på 22% af *RHD*-positive blandt personer med dCe-haplotypen [9]. Vi har ikke klarlagt den molekylære baggrund for vores observation, men den er et eksempel på de genetiske varianter, der må forventes ved bestemmelse af *RHD*-genotype. Den kliniske konsekvens ville i dette tilfælde være, at der gives RH-profylakse uden grund, hvilket dog er ufarligt for den enkelte gravide og hendes foster. Den omvendte situation, at der fejlagtigt bestemmes et RhD-negativt foster, blev ikke set i vores materiale. En falsk negativ analyse ville betyde, at moderen ikke fik antenatal RH-profylakse, men efter fødslen ville den serologiske rhesustypning af navlesnorsprøven vise den korrekte blodtype, og RH-profylaksen ville blive givet. Profylaksen ville da blive lige så god som den i dag anvendte.

Det er væsentligt at gøre sig klart, hvilken klinisk opgave man søger at løse med *RHD*-genotypebestemmelse. Vores mål

var at udvikle en sikker og præcis test til bestemmelse af RhD-type til anvendelse ved antenatal RH-profylakse i Danmark. Vores *RHD*-specifikke gensekvenser er valgt blandt de områder af *RHD*-genet, der afviger mest fra *RHCE*-genet, og som samtidig findes i alle de væsentligste *RHD*-varianter, der forventes at være i den danske befolkning.

Vores resultater viser, at vi kan imødekomme behovet for en RhD-bestemmelse før uge 28 i forbindelse med antenatal profylakse. Ved udredning af immuniserede kvinder giver vores analyse en sikker bestemmelse ned til 16. gestationsuge. Ved negative og inkonklusive resultater bør moderen testes igen efter en uge.

Yderligere undersøgelser vil vise analysens værdi til forudsigelse af RhD-blodtype før 16. gestationsuge.

Korrespondance: Frederik Banch Clausen, H:S Blodbank, KI 2034, H:S Rigshospitalet, DK-2100 København Ø. E-mail: frederik.banch.clausen@rh.dk

Antaget: 27. marts 2006

Interessekonflikter: Ingen angivet

Taksigelse. Dette projekt blev støttet af Toyota-Fonden, Beckett-Fonden og Blod-donorernes Forskningsfond.

This article is based on a study first reported in the Prenatal Diagnosis 2005;25: 1040-4.

## Litteratur

1. Daniels G, Finning K, Martin P *et al*. Fetal blood group genotyping from DNA from maternal plasma: an important advance in the management and prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn. *Vox Sang* 2004;87:255-60.
2. Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF *et al*. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485-7.
3. Lo YMD, Zhang J, Leung TN *et al*. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999;64:218-24.
4. Lo YMD, Tein MSC, Lau TK *et al*. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998;64:768-75.
5. Lo YMD, Hjelm NM, Fidler C *et al*. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med* 1998;339:1734-8.
6. Legler TJ, Lynen R, Maas JH *et al*. Prediction of fetal Rh D and Rh CcEe phenotype from maternal plasma with real-time polymerase chain reaction. *Transfus Apheresis Sci* 2002;27:217-23.
7. Rouillac-Le Sciellour C, Puillandre P, Gillot R *et al*. Large-scale pre-diagnosis study of fetal RHD genotyping by PCR on plasma DNA from RhD-negative pregnant women. *Mol Diagn* 2004;8:23-31.
8. Finning KM, Martin PG, Soothill PW *et al*. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion* 2002;42:1079-85.
9. Wagner FF, Frohmajer A, Flegel WA. RHD positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genet* 2001;2:10.