

Antenatálna genotypizácia génov krvných skupín plodu z krvi matky

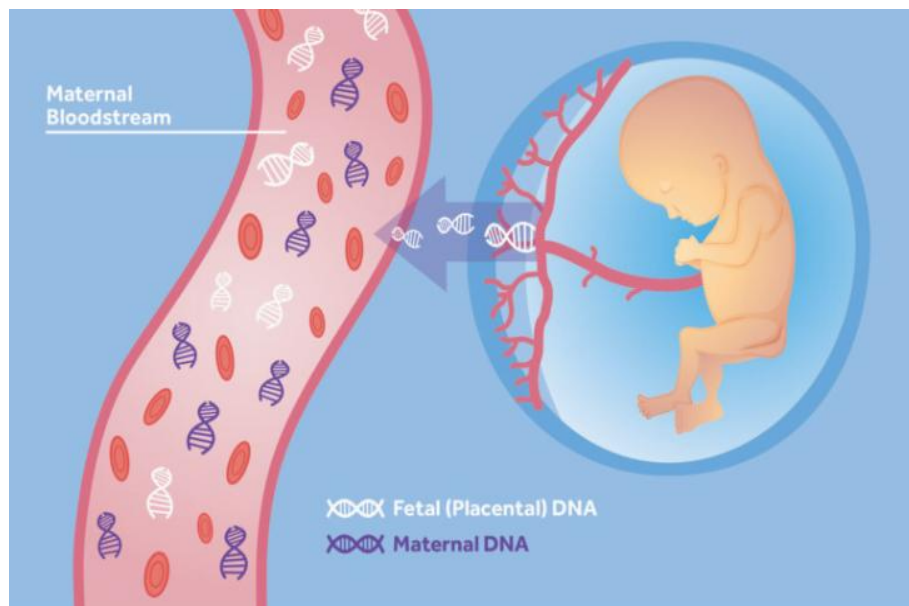
Marta Kučeráková, Janka Čamajová

Oddelenie Hematológie a krvnej banky FNsP Žilina

Klinická biochémia s. r. o.- oddelenie molekulovej genetiky.

Antenatálna genotypizácia plodu z krvi matky

Antenatálna genotypizácia plodu z krvi matky vo všeobecnosti poskytuje informácie o vývoji plodu, umožňuje včasné odhalenie genetických a vývojových abnormalít a identifikuje tehotenstvá so zvýšeným rizikom postihnutia plodu ochorením vyšetrením cffDNA.

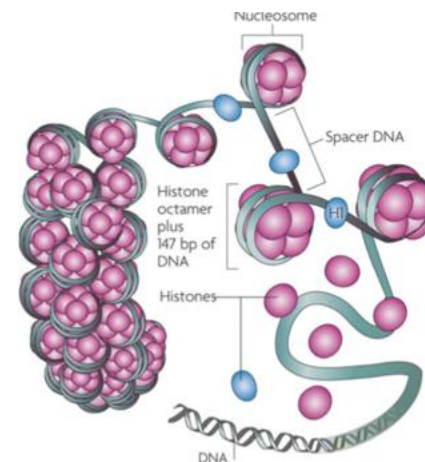


História

- prenatalná diagnostika má počiatky v 60-tych rokoch 20. storočia,
- invazívne zákroky (aminocentéza, kordocentéze) zvyšujú riziko straty plodu na 0,5 – 1 %,
- objav cirkulujúcej fetálnej DNA v r.1989 významne zmenil postupy genotypizácie plodu,
- Lo a kol. prví úspešne opísali použitie cffDNA izolovanej z krvi tehotnej ženy na vyšetrenie *RHD* genotypu plodu v r.1993,
- v r. 2001 začalo MRL v Bristole ponúkať prenatálne testovanie cffDNA *RHD* pomocou kvantitatívnej PCR.

Voľná cirkulujúca fetálna DNA

- plazma tehotnej ženy obsahuje chimerickú zmes voľnej materskej a fetálnej DNA (cffDNA), ktorá
 - pochádza z buniek trofoblastu placenty degradovaných apoptoticky,
 - v krvi matky sa vyskytujú cirkulujúce fragmenty celkovej cfDNA- sú genomické, dvojvláknové, pričom veľkosť hlavnej populácie fragmentov fetálnej cfDNA je veľkosti 143 párov báz a materskej cfDNA cca 166 párov báza.
 - veľkosť zodpovedá dĺžke DNA zvinutej okolo 1 nukleozómu, základnej jednotky usporiadania DNA.



Množstvo cffDNA počas gravidity

- cffDNA možno detegovať v materskej krvi už od 5. t. g.,
- % zastúpenie cffDNA v plazme tehotnej je variabilné a mení sa v závislosti na:
 - na veľkosti placenty,
 - hmotnosti ženy i plodu,
 - **! gestačného veku:** % cffDNA sa zvyšuje s postupujúcim gestačným vekom a v 11. týždni predstavuje približne 10 % celkovej cfDNA, čo umožňuje bezpečnejšie testovanie a diagnostiku,
 - v 11. - 20 t. g. sa cffDNA zvyšuje pomaly, cca o 0,10 % týždenne,
 - **!!! od 21 t. g. sa zvyšuje množstvo 1% týždenne.**

Table 1| Prediction of fetal RhD status by fetal RhD genotyping of cell-free DNA in maternal plasma compared with results of cord blood typing of RhD

	Gestational age in completed weeks*					Total samples
	<11	11-13	14-17	18-23	>24	
Correct RhD negative	337	341	225	321	696	1920
Correct RhD positive	400	535	272	492	864	2563
False RhD negative	16	1	1	1	0	19
False RhD positive	1	4	1	5	7	18
Inconclusive confirmed RhD negative	19	13	10	19	24	85
Inconclusive confirmed RhD positive	92	62	33	50	71	308
Total	865	956	542	888	1662	4913
Sensitivity RhD positive (95% CI)†	96.85 (94.95 to 98.05)	99.83 (99.06 to 99.97)	99.67 (98.17 to 99.94)	99.82 (99.96 to 99.99)	100.00 (99.59 to 100.00)	99.34 (98.98 to 99.58)
Specificity RhD positive (95% CI)†	94.40 (91.51 to 96.34)	95.25 (92.53 to 97.01)	95.34 (91.85 to 97.38)	93.04 (89.86 to 95.28)	95.74 (94.01 to 96.98)	94.91 (93.86 to 95.78)

*Gestational ages shown are in completed postmenstrual weeks (for example, 11 weeks=11 weeks 0 days to 11 weeks + 6 days).

†Assuming all inconclusive results are treated as RhD positive.

Izolácia cffDNA

- kritická fáza vyšetrenia

Fetálna DNA je prítomná len vo forme krátkych fragmentov a na pozadí veľkého množstva materskej DNA.

- hrozí riziko kontaminácie *RHD* pozitívnou exogénnou DNA,
- /falošná pozitivita nepredstavuje zvýšené riziko rozvoja aloimunizácie/,
- zvýšené riziko chybného klinického manažmentu predstavuje **falešná negativita**,
- použitie vnútornej kontroly amplifikácie *HGH* génu, *SRY* u plodov mužského pohlavia pomáha znížiť riziko falošne negatívneho výsledku.

Izolácia cffDNA:

1. **Odber:** krv sa odoberá do EDTA al. ideálne do skúmaviek zabráňujúcich rozpadu materských Leu.
2. **Separácia:** centrifugácia na získanie čistej plazmy.
3. **Extrakcia** cfDNA z plazmy komerčnými kitmi- kremíková (silica-based) purifikácia al. magnetické čiastočky zachytávajúce krátke fragmenty DNA.

Riešenie nízkej výťažnosti cfDNA

- väčší objem odobratej vzorky (6 - 20 ml),
- zníženie objemu eluátu pre zvýšenie koncentrácie DNA,
- minimalizovanie času medzi odberom a izoláciou cfDNA, ideálne do 4 hodín,
- skontrolovanie účinnosti centrifugácie.

Význam antenatálnej genotypizácie KS plodu

- vyšetrenie fetálnej *RHD* v súvislosti s nutnosťou antenatálnej imunoprofylaxie RhIG,
- diagnostika hemolytickej choroby plodu/ novorodenca,
- diagnostika neonatálnej aloimunitnej trombocytopénie.

SúčasnÉ možnosti prenatalnej genotypizácie génov KS plodu

- v Európe sú dostupné vyšetrenia genotypu z cffDNA pre gény kódujúce antigény D, C, c, E, e, K, HPA-1a,
- na Slovensku dostupné vyšetrenie *RHD*.

Metódy vyšetrení cffDNA:

- Real –Time PCR,
- Droplet Digital PCR,
- NGS (new generation of sequencing),
- kapilárna elektroforéza,
- MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time of-flight mass spectrometry).

Senzitivita a špecificita jednotlivých metod

Method	Target blood groups	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)	Total DNA control	Control for fetal DNA	Gestation weeks	Sample size
Sequencing	Kell			100			17–31	3
	ABO			100			12–35	26
	Rh, Kell, Fy, Jk and MNS			100			12–38	13
	RHD			100			9–30	8
ddPCR	RHD	100	100	100	GAPDH		12–36	35
	RHD	100	95.5–100	95.6–100		SRY+ TSPY1	28–30	46
	RHCE, Kell, Fy			100		SRY + RASSF1A	10–37	4–46
	Kell			94			12–35	32
Mass spectrometry	RHD			100		Y-STR	12–39	13
Capillary electrophoresis	RHD			100		52 SNPs	10–36	223
	RHD	95.2–98.6	100	97.9–99.4		AMELX/Y	7–23	337
	RHCE, Kell			100	CCR5		10–35	13–70
Real time PCR	RHCE	100	100	100	β-globin		12–28	46–100
	Rh, Kell	100	100	100	Albumin	SRY + set of 24 markers	7–38	49–168
	Rh, Kell	100	95.5–100	97.7–	CCR5	SRY + set of	5–39	24–407

Čo hovoria platné štandardné postupy o podaní RhIG?

Podanie RhIG u nesenzibilizovaných RhD NEG tehotných v SR:



- rutinné profylaktické podanie RhIG redukuje incidenciu RhD aloimunizácie u RhD NEG tehotných na 0,1-0,3 % (pokles z 16 % pred podávaním RhIG)
- **ak nie je možné vyšetrit' RHD plodu z krvi matky -odporúča** sa profylaktické podanie RhIG u RhD NEG žien v tehotenstve **1 500 IU v 28.- 30. gestačnom týždni**,
- podanie RhIG (1 500 IU) do 72 hodín po pôrode v prípade pôrodu RhD POZ novorodenca (vyšetrenie z pupočníkovej krvi)

Názov:

Prenatálna starostlivosť o nízkorizikovú (fyziologickú) tehotnosť

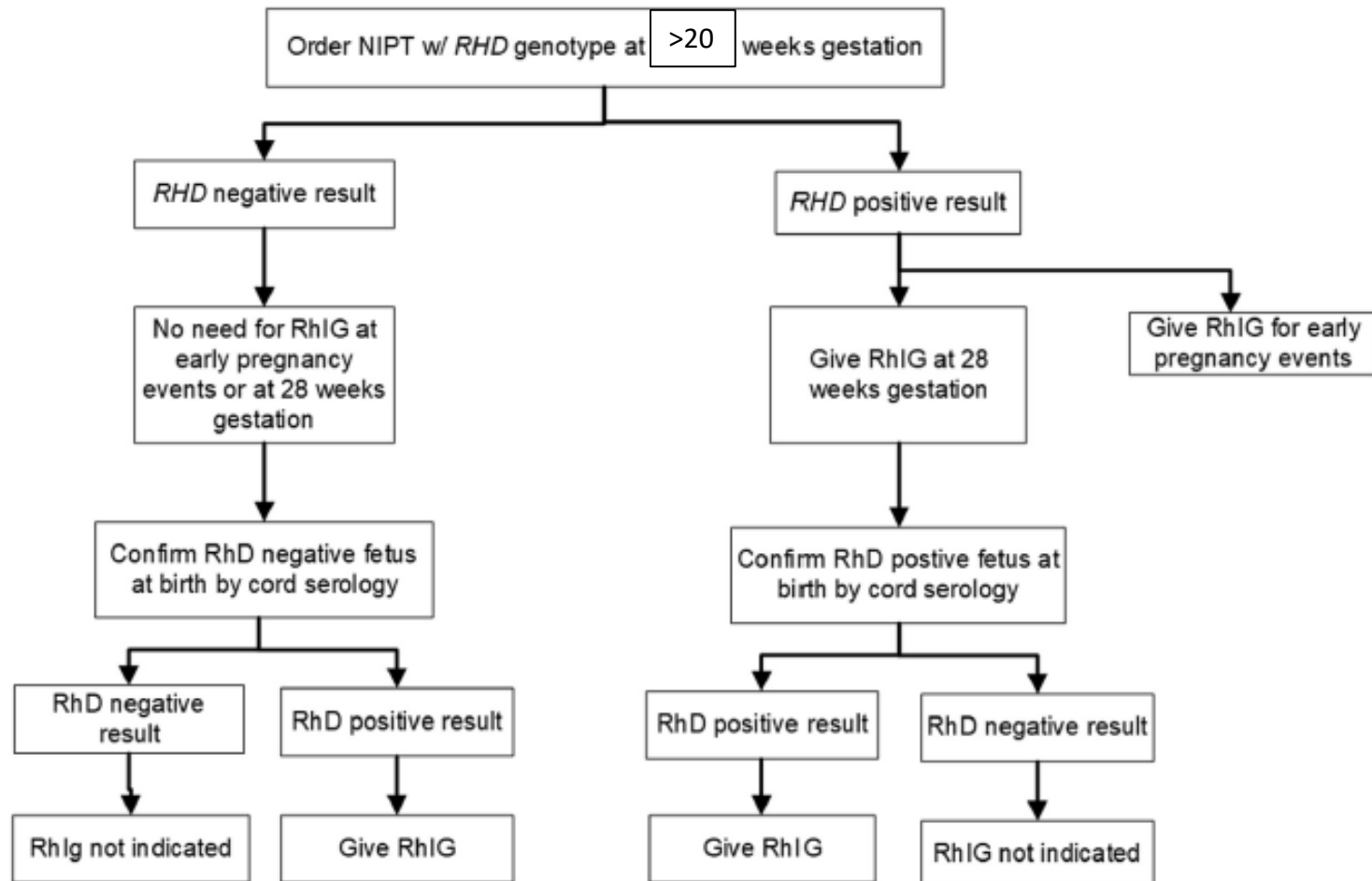
Autori:

doc. MUDr. Alexandra Krištúfková, PhD.
prof. MUDr. Miroslav Borovský, CSc.

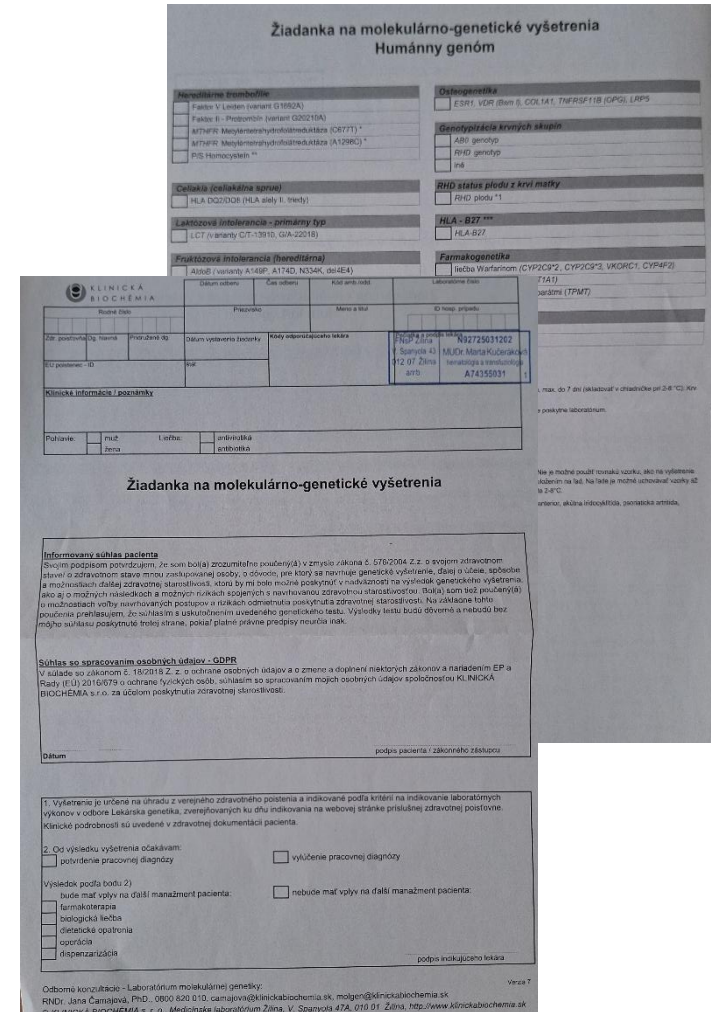
Špecializačný odbor:

Gynekológia a pôrodníctvo

Manažment antenatálnej imunoprofylaxie RhIG

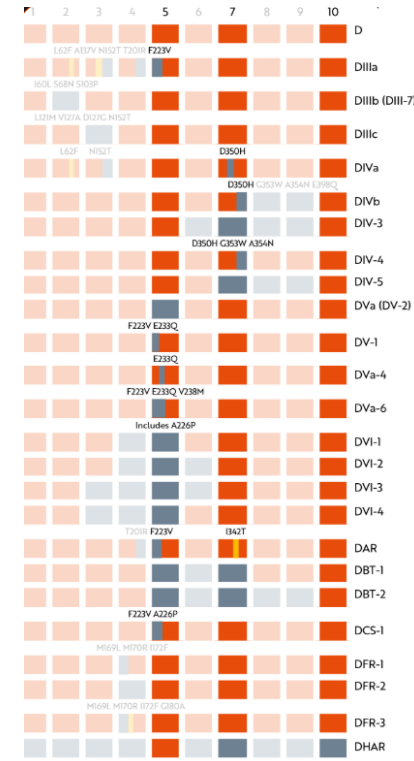
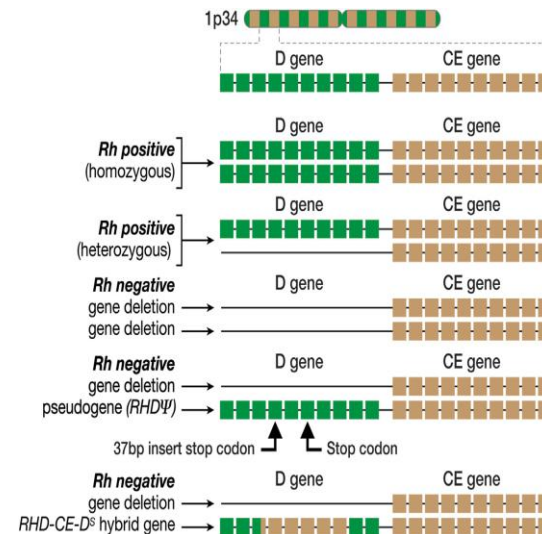


- vzorka 6-12 ml periférnej krvi sa odoberá po 20. t. g. do skúmaviek s EDTA,
- skladovanie a transport pri 4 – 10 °C do 36 hodín od odberu.

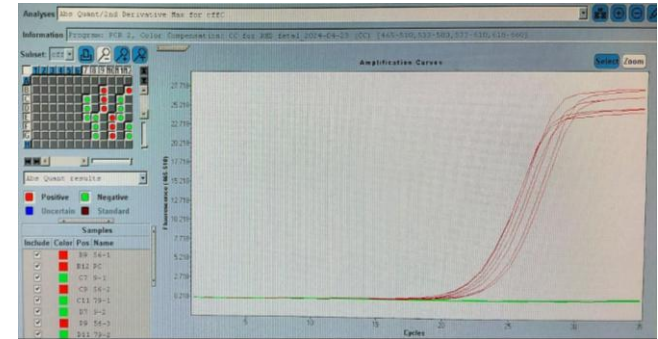
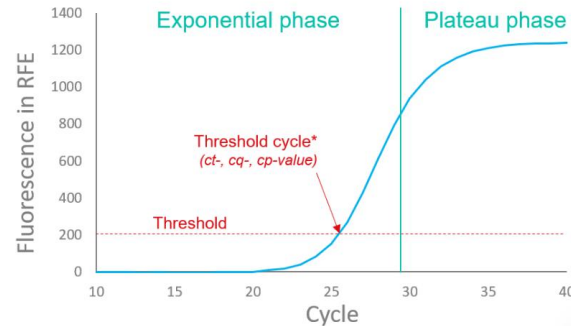


Vyšetrenie *RHD* z cffDNA

- predpokladom spoľahlivej analýzy-vzorka s dostatočným množstvom cffDNA,
- ideálne po 20. t. g.,
- testovanie je možné po 11.t. g.,
- vzhľadom na vysoký počet variantných foriem aliel *RHD* sa pri analýze pri Real Time PCR vyšetrujú viaceré exóny génu *RHD*.
- detekciou troch exónov: 5, 7 a 10 je pravdepodobnosť falošne negat. výsledku minimalizovaná.



PCR v reálnom čase



- PCR v reálnom čase- umožňuje kvantitatívne stanovenie množstva amplifikovaného genetického materiálu v reálnom čase pomocou fluorescenčne značených DNA oligonukleotidov.
- kvantifikácia sa realizuje fluorescenčnými signálmi, kt. sú generované hydrolytickými sondami (napr. TaqMan). Tieto sa špecificky naväzujú na jednovláknovú DNA.
- fluorescenčná emisia reportérového fluoroforu excitovaného svetelným zdrojom je v reálnom čase zobrazovaná termálnym cyklerom ako krivka. V exponenciálnej fáze sa PCR produkty znásobujú.

Výsledky rutinného *RHD* skríniového testovania z cffDNA

Krajina	Počet vzoriek	Cieľové exóny	Gestačný týždeň-odberu vzoriek	Senzitivita (%)	Špecificita(%)
Holandsko	25 789	5, 7	27 - 29	99,94	97,74
Nórsko	16 378	7, 10; 5, 7, 10	24	99.93	99.24
Nemecko	12 688	5, 7; 5, 10; 7, 10	24–26	99.86	99.3
Fínsko	10 814	5, 7	24 - 26	99.99	99.81
Švajčiarsko	7072	5, 7	18 -24	100	99,96
Švédsko	6948	4	10 - 15	99,95	100
Švédsko	4337	4	10 - 12	99.93	99.56
Anglicko	502	5, 7	15 -17	100	100
Taliansko	116	5, 7, 10	22 - 24	100	97,9
Belgicko	127	5,7	≥ 11	100	100

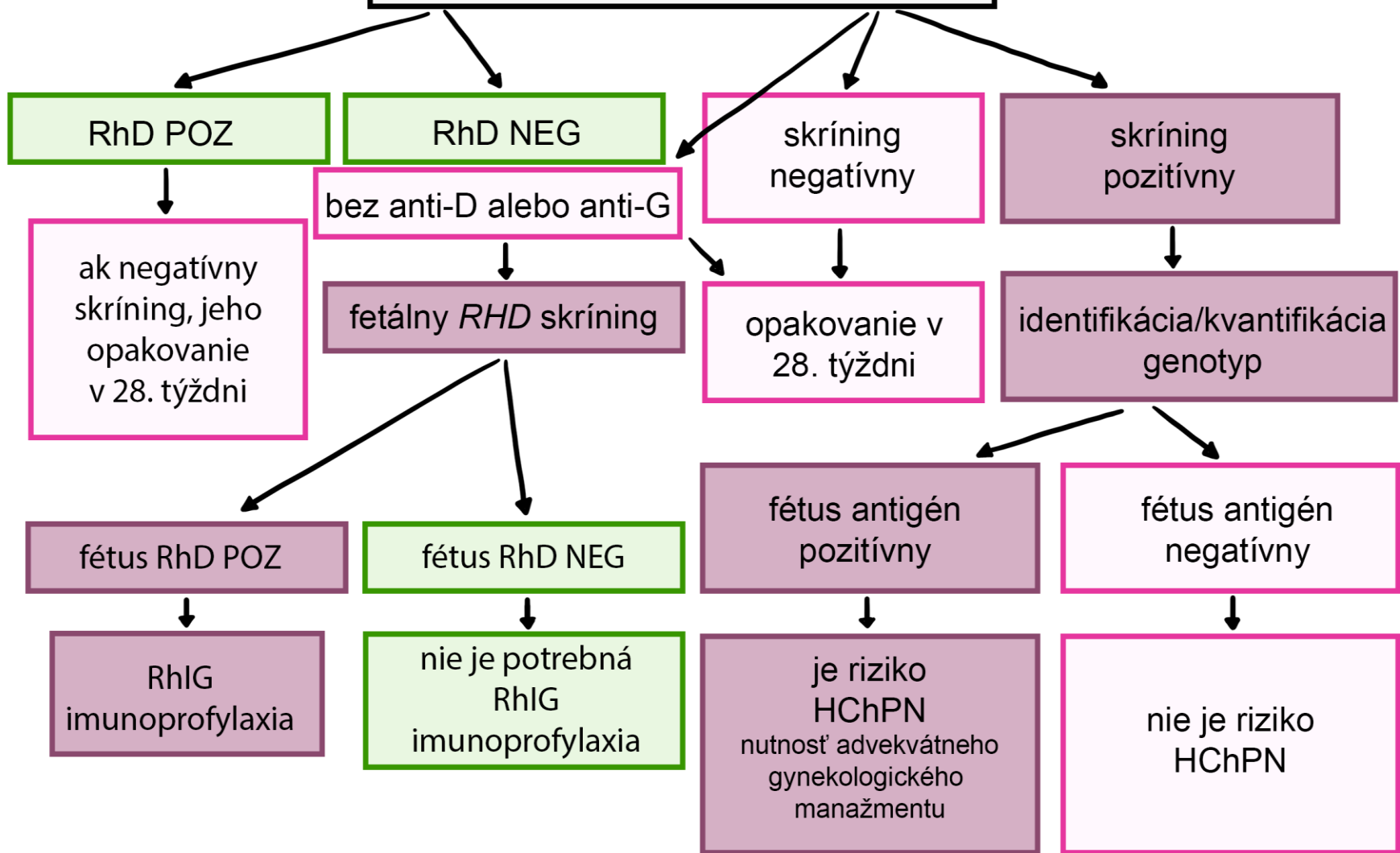
Prehľad používaných metód v rôznych krajinách pri vyš. *RHD* z cffDNA

Table 1: Noninvasive fetal *RHD* typing studies from different countries showing 100% sensitivity

Study	Country	Method	Number of samples	Gestational weeks	Replicates	<i>RHD</i> exons	Control
Wang <i>et al.</i> 2009 ^[34]	China	Real time	78	14-40	3	5, 7, 10 intron 4, <i>RHD</i> 1227A allele in all RhD positive individuals	β-globin, SRY, STRs
Hyland <i>et al.</i> 2009 ^[35]	Australia	Real time	140	12-40	4	4, 5, 10	CCR5, SRY, RASSF1A
Cardo <i>et al.</i> 2010 ^[36]	Spain	Real time	111	9-13	3	5, 7	HBB
Tynan <i>et al.</i> 2011 ^[37]	USA, San Diego	Mass spectrometry	150	<32	1	4, 5, 7, 10 and <i>RHD</i> pseudogene	Albumin, AMG, SRY ^a
Amaral <i>et al.</i> 2011 ^[38]	Brazil	Real time	88	11-39	3	4, 5, 10	SRY, CCR5
Tounta <i>et al.</i> 2011 ^[39]	Greece	Multiplex fluorescent polymerase chain reaction	84	7-24	2	7, 10	SRY, RASSF1A, ACTB
Macher <i>et al.</i> 2012 ^[40]	Spain	Real time	1146	10-28	2	5, 7	SRY
Grande <i>et al.</i> 2013 ^[41]	Spain	Real time	282	24	3	5, 7, 6, 10	DYS14; SRY, β-actin
Ordoñez <i>et al.</i> 2013 ^[42]	Spain	Real time	158	13-28	3	5, 7, 10	DYS14, SRY, β-actin
Dovc-Drnovšek <i>et al.</i> 2013 ^[43]	Slovenia	Real time	5	<14	3	Intron 4, 5, 7, 10	SRY, albumin
Aykut <i>et al.</i> 2013 ^[44]	Turkey	Real time	30	9-39	2	7, 10	SRY, FOXP1
Schmidt <i>et al.</i> 2014 ^[45]	Brazil	Real time	43	12-29	2	5, 7	SRY, albumin

^aIn case of a negative result for *RHD*, testing for SRY was not used to confirm the presence of fetal DNA

RhD a skrining Ab



HChPN - kazuistika

TO: konzultačné vyš. 32 ročnej pacientky pre vysokú hodnotu titra protilátky anti-K v 21. t. g.

GA: P:1 x v r.2022, priebeh gravidity a pôrodu bez komplikácií,

TA: 0,

OA: bez vážnejšieho predchorobia

Obj. nález: výška 170 cm, váha 113 kg, gravidita 25 t., DK bez opuchov a zn. flebitídy

Laborat. vyšetrenie: **HGB**: 113,0; **B_Htk**: 0,346; **B_MCV**: 86,50; **B_MCH**: 28,30; **WBC**: 11,17 **PLT**: 304,0; **S_Fe**: 6,6; **S_VKFe**: **75,8**; **S_TIBC**: 82,4; **S_TRF**: 3,81; **S_STf**: **0,08**; **S_ITRF**: 0,14; **S_Ferr_**: 13,7; **S_AKTb12**: 56,0; **S_Kys.list.**: 13,18

Imunohematologické vyšetrenie 19.9.25: nález antierytrocytovej aloprotilátky anti-K triedy IgG, podtriedy IgG1 v titri 1:1024 (vyšetrenie s K+k+ realizované stĺcovou aglutináciou)

Otec dieťaťa: fenotyp ery: K+k+

Záver: antierytrocytová aloprotilátka anti-K triedy IgG, podtriedy IgG1 v titri 1:1024 v 21 t.g. (heterozygot dg ery SA/NAT)

↓

Ústav lekárskej genetiky FN Olomouc:

Záver: *KEL* genotyp: 95% pravdepodobnosť: **NEpřítomnosti** alely *KEL1*, kt. odpovídá přítomnosti erytrocytárního antigenu "K".

Popis postupu: **emulzní digitální PCR s využitím TaqMan sond** pro detekci varianty NM_000420.3: c.578C>T v genu *KEL*. Popis metody: emulzní digitální (droplet digital PCR, ddPCR)

V termíne sa narodil Martinko s Hb 176 g/l bez zn. HChPN.

Ústav lékařské genetiky FN Olomouc-

požadavky na odber pri vyš. *KEL*

1) EDTA 9ml, ideálne do 4 hod pri 4-8 °C.

Počet skúmaviek 2-4

2) Streck - Cell-Free DNA BCT®, dodanie vzorky do 96 hod pri 4-25°C.

Počet skúmaviek 2-4

3) CellSave Preservative Tubes, dodanie vzorky do 96 hod pri 4-25°C

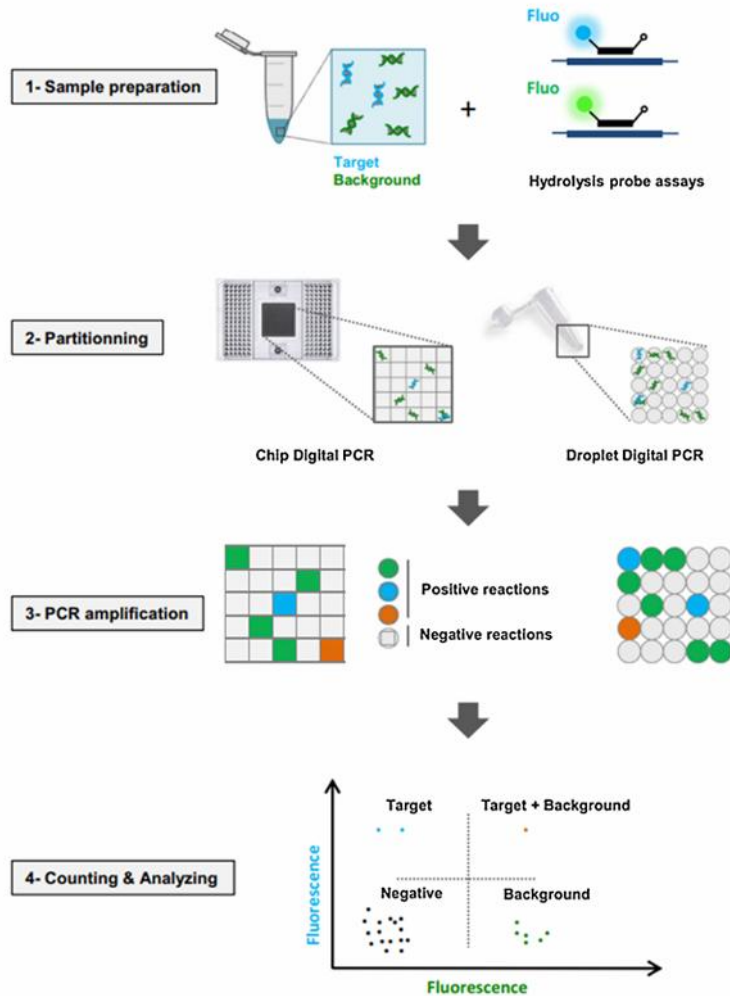
Počet skúmaviek 2-4

Samoplatca od 1/2020: 14590,-Kč.

Doba odozvy je 2-3 týždne, Presnosť stanovenia: 95 % - 99 %.



Droplet digital PCR



Princíp: rozdelenie vzorky DNA do nanolitrových „kvapôčok“ v olejovej emulzii ► priebeh mnohých samostatných reakcií:

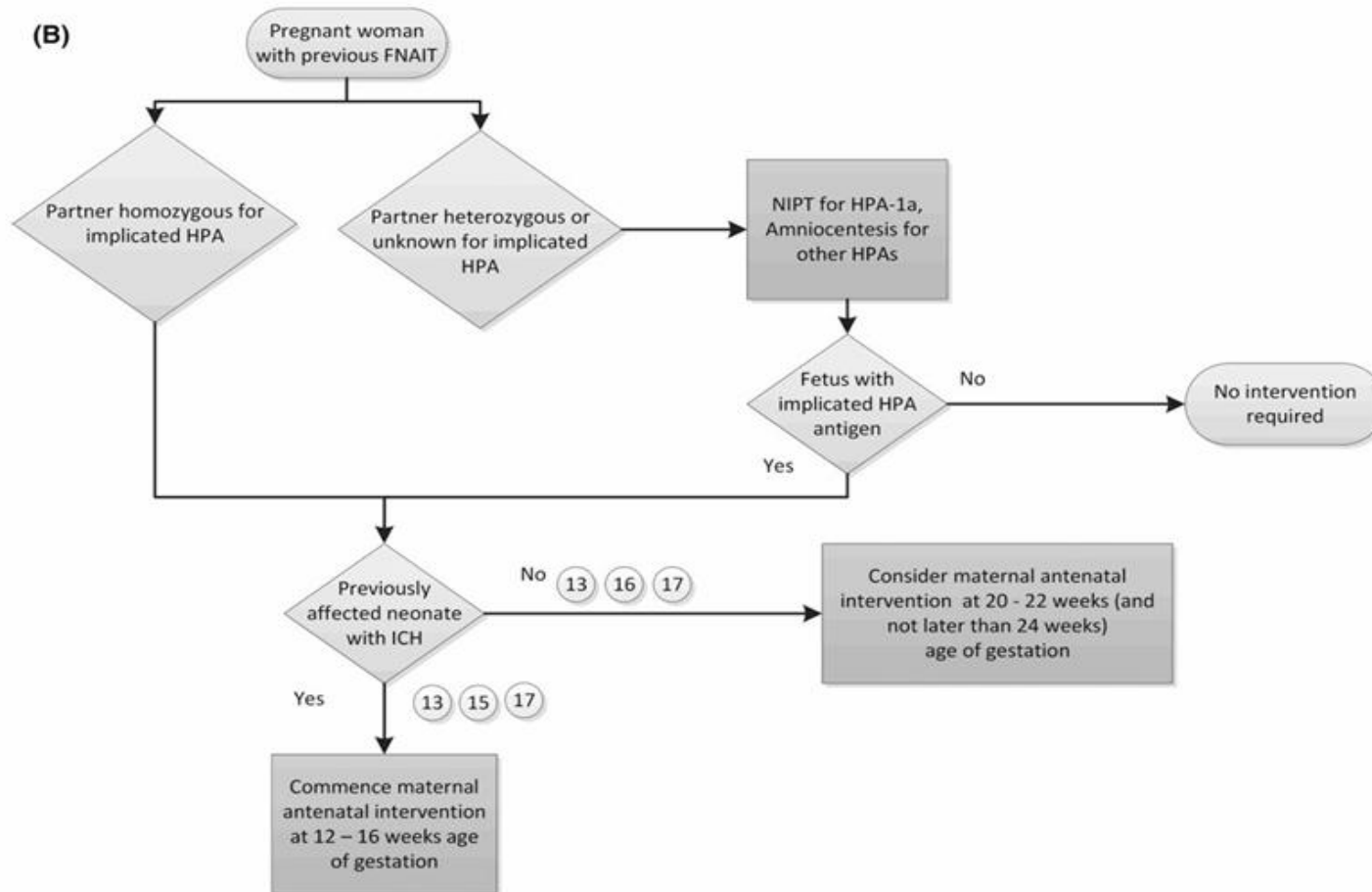
Fázy vyš. : partitioning, amplifikácia, detekcia a analýza dát ► Poissonovo štatistické rozdelenie- z pomeru pozit. a negat. kvapôčok sa vypočíta absolútny počet kópií v pôvodnej vzorke,

- vhodné pri genotypizácii SNP, je citlivá a presná, umožňuje priamu kvantifikáciu cieľových molekúl a deteguje rozdiely v počte kópií,
- je výhodná pre suboptimálne vzorky s nízkym obsahom fetálnej frakcie DNA.

Fetálna/neonatálna aloimunitná trombocytopenia

- materská aloimunizácia proti antigénom HPA-1a je najčastejšou príčinou ťažkých prípadov fetálnej/neonatálnej aloimunitnej trombocytopenie (FNAIT) v kaukazskej populácii- 80 % hlásených prípadov,
- neinvazívne vyšetrenie fetálneho HPA-1a sa vykonáva na diagnostické účely v tehotenstvách u aloimunizovaných matiek detí s FNAIT,
/súčasne sa zisťuje otcovská zygozita HPA-1a/,
- ak je otec heterozygot HPA-1a1b, existuje 50 % pravdepodobnosť, že fétus bude HPA-1a negatívny, nie je potrebná liečba IVIG (1-2 g/kg týždenne) +-kortikosteroidmi (prednizon 0,5 mg/kg/deň) !!
- v Nórsku, Dánsku, v Spojenom kráľovstve a Holandsku prebehli diskusie o zavedení systematického HPA-1a typizovania všetkých tehotných žien,
- žiadna krajina však zatiaľ nezaviedla skriningový program na identifikáciu tehotenstiev ohrozených FNAIT.

Antenatálny algoritmus FNAIT



Prehľad aktuálne používaných metód fetálnej genotypizácie HPA-1

Metóda	Najskorší možný čas vyšetrenia	Výhody	Nevýhody
RT PCR post-Mspl natrávenie	2.trim. 18. t.	sekvenčne-špecifická reštrikcia enzýmového natrávenia HPA-1b alely s cieľom minimalizovania jej amplifikácie	problematické dosiahnutie alelovej špecificity bez internej kontroly pre fetálnu DNA
Alelovo-špecifická RT PCR	2.trim. 18. t.	jednoduchá PCR metodika	bez internej kontroly pre fetálnu DNA
PCR HRM	2.trim. 15. t.	jednoduchá PCR metodika nízka cena nie je potrebné unikátne farbivo na označenie prób	bez internej kontroly pre fetálnu DNA
COLD-PCR	1.trim. 12. t.	jednoduchá PCR metodika vyššia senzitivita v porovnaní s konvenčnou RT PCR	bez internej kontroly pre fetálnu DNA
NGS	13. t.	interná kontrola pre fetálnu DNA	vysoká cena nutnosť bioinformatickej podpory potrebnej pre hodnotenie výsledkov
Digitálna PCR	1.trim. 8. t.	rozdelenie aliel minimalizuje kompetíciu materských aliel vysoká senzitivita vysoká presnosť	slabý prah signálu môže viesť k falošnej pozitivite variabilita objemu kvapiek ovplyvňuje presnú kvantifikáciu

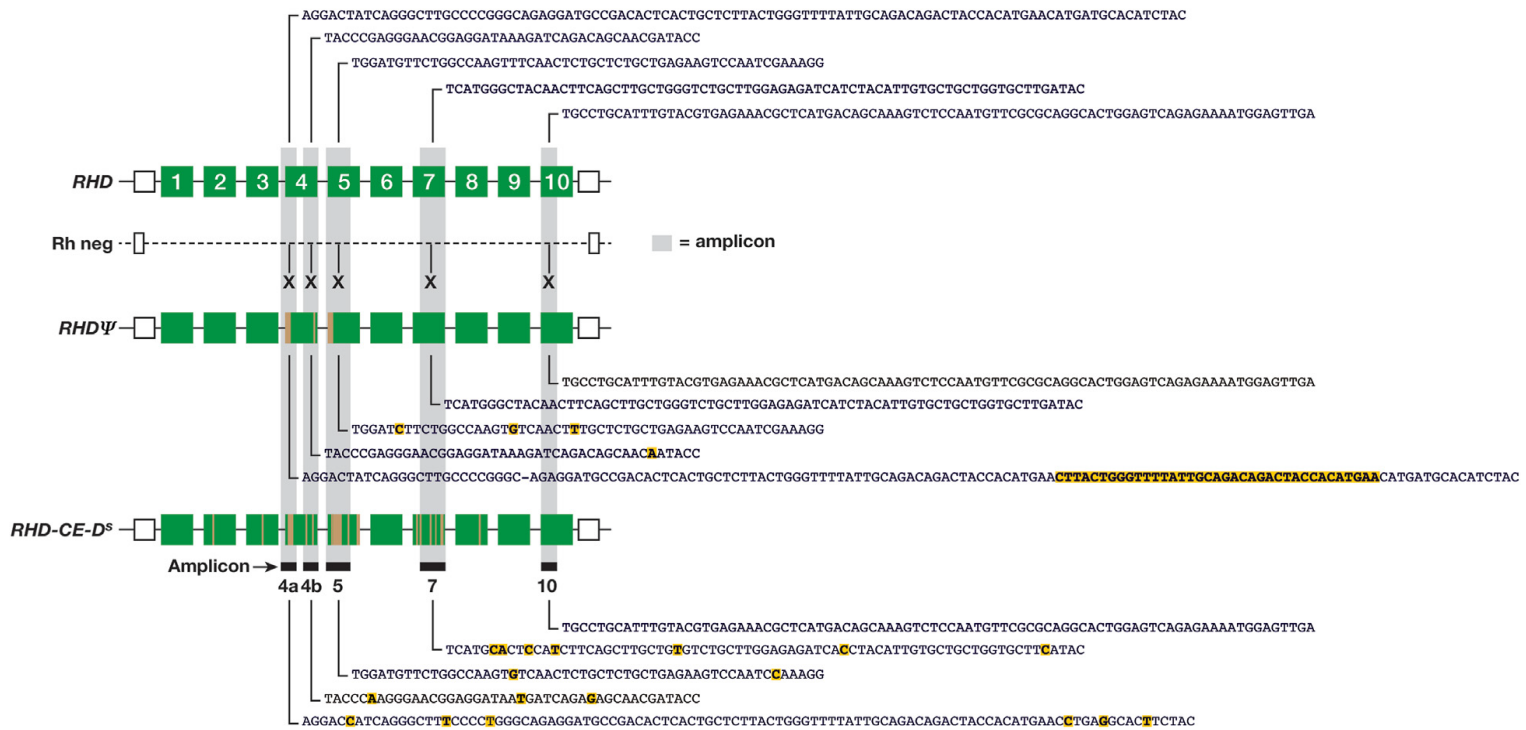
COLD-PCR - co-amplification at lower denaturation temperature PCR, HRM- high-resolution melting

Nová generácia sekvenovania

- silnou stránkou sekvenovania novej generácie/masívneho paralelného sekvenovania je možnosť multiplexovať veľký počet vzoriek a cieľov v jednom teste,
- citlivosť závisí od hĺbky sekvenovania,
- technika je stále dosť prácna a drahá, vyžaduje skúsenosti,
- Rieneck et al. vyvinuli sekvenačné testy pre krvné skupiny Kell a ABO z fetálnej cfDNA,
- Orzińska et al. sa podarilo určiť fetálne krvnú skupinu klinicky najdôležitejších systémov Rh, Kell, Fy, Jk a MNS,
- Wienzek-Lischka sekvenoval indikátorové SNP týchto rovnakých systémov, ale test bol primárne určený na sekvenovanie ľudského trombocytového antigénu 1, a alely krvných skupín fungovali ako interné značky.

Nová generácia sekvenovania

- šedé vertikálne boxy označujú polohu amplicónov na rôznych exónoch génov *RHD*, *RHD Ψ* a *RHD-CE-D*. Žlté písmená označujú rozdiely v sekvencii báz oproti génu *RHD*, ktoré sú detegované konkrétnymi amplicónmi.



MALDI-TOF MS

- je metóda založená na rozdieloch v hmotnosti amplifikovaných sekvencií.
- fetálna DNA sa najprv amplifikuje špecifickými primermi a výsledné amplikóny sa potom separujú na základe ich veľkosti kapilárnou elektroforézou.
- časovo náročnejšia metóda ako qPCR kvôli samostatnému kroku elektroforézy po amplifikácii.
- na rozdiel od qPCR nie sú potrebné žiadne sondy, citlivá metóda na typizáciu fetálnej RHD.

Záver

- antenatálna genotypizácia génov krvných skupín plodu je dnes štandardná súčasť antenátálnej diagnostiky,
- antenatálne vyšetrenie *RHD* plodu prispieva k sofistikovanejšiemu manažmentu gravidity RhD negatívnych žien,
- antenatálne vyšetrenie *RHD* je dnes rutinne dostupné !!!,
- otázkou zostáva možnosť antenatálneho vyšetrenia ostatných krvných skupín na Slovensku

Ďakujem za pozornosť

