

RhD profylakseundersøgelse, en ny æra

– fra serologisk til molekylærgenetisk metode

I slutningen af 1960'erne indførtes RhD profylakse (dengang Rhesusprofylakse) til RhD negative kvinder, der havde født et RhD positivt barn. Et nyfødt barns RhD blodtype bestemmes på erythrocytterne fra en navlesnorsblodprøve med hæmagglutination, en serologisk metode. Den 1. januar 2010 indførtes der en prænatal *RHD* screening udført på cellefrit foster DNA (cffDNA) oprenset fra plasma fra RhD negative gravide i deres 25. graviditets uge. Undersøgelsen udføres med real-time PCR, en molekylærgenetisk metode. De to analyser har nu været udført sideløbende i 4 år, og resultaterne fra den molekylærgenetiske metode har været så overbevisende, at et udvalg under Dansk Selskab for Klinisk Immunologi (DSKI), besluttede, at den molekylærgenetiske metode pr 1/1 2014 skulle overtage rollen som rutineanalyse.

Den serologiske RhD bestemmelse skal i fremtiden kun udføres, hvis der ikke er udført en prænatal molekylærgenomisk *RHD* screening.

Denne artikel er baseret på artiklen af Clausen et al. publiceret i *Prenatal Diagnosis* 2014 (1), suppleret med lidt baggrundsviden, der kan hjælpe med at forstå nogle af de valg, der er truffet under processen.

Baggrund

RhD immunisering er en af de hyppigste årsager til hæmolytisk sygdom hos fostre og nyfødte (HDFN), på trods af indførslen af postnatal RhD profylakse i slutningen af 1960'erne. I 2001 behandlede man på danske centre 92 tilfælde af svært Rh-immuniserede gravide. Tilstanden var så alvorlig hos 9 af de gravide kvinder, at de tilsammen fik ca. 50 intrauterine blodtransfusioner (2). I mange europæiske lande som vi normalt sammenligner os med, anvendes såvel prænatal som postnatal RhD profylakse, hvilket har vist at nedsætte immuniseringsrisikoen med ca 50%. Den prænatale RhD profylakse bliver givet til alle RhD negative gravide uanset fosterets RhD blodtype, hvilket medfører unødvendig behandling med anti-D af de ca. 40% kvinder, der er gravide med et RhD negativt foster.

I 1997 viste Lo et al. (3), at der i plasma fra en gravid kvinde findes DNA fra hendes foster. Dette DNA kommer ikke fra celler, men fra vesikler afsnøret fra fosterdelen af moderkagen. Når der oprenses DNA fra plasma fra en gravid, vil der være DNA fra mater såvel som fra foster. Af den totale mængde DNA vil 1-20 % være fostrets DNA. I 1998 viste Lo et al. (4), at dette DNA kunne anvendes, vha. en PCR reaktion, til at forudsige et fosters RhD blodtype.

I starten af det tyvende århundrede arbejder flere danske laboratorier, bl.a. på klinisk immunologisk afdeling Rigshospitalet, videre med cffDNA med henblik på at udvikle en pålidelig metode til at bestemme *RHD* status på fostre (5). Et udvalg under DSKI arbejder sammen med Sundhedsstyrelsen på en forbedring af forebyggelsen af RhD immunisering. Som resultat af dette arbejde indføres der i Danmark, som det første sted i verden, målrettet prænatal RhD profylakse 1. januar 2010. Det vil sige, at der indføres prænatal genomisk *RHD* screening i 25. graviditetsuge på fostre af RhD negative kvinder. På baggrund af svaret forudsiges fosterets RhD blodtype, og kun RhD negative kvinder, der er gravide med et RhD positivt foster, tilbydes RhD profylakse. Den serologiske RhD profylakseundersøgelse udført på navlesnorsblod bliver fortsat udført, og den postnatale RhD profylakse bliver givet på baggrund af dette svar.

Da alle 5 regioner i Danmark skulle udføre analysen, blev det besluttet at nedsætte et udvalg med repræsentanter fra Klinisk Immunologisk Afdeling, Universitetshospitalerne i København, Aalborg, Århus, Næstved, Odense. Udvalgets arbejde skulle omfatte samarbejde omkring evaluering, kvalitetsudvikling, dokumentation mm. Ud af dette samarbejde er der nu udkommet to artikler, hvoraf den sidste er en artikel med de samlede resultater fra de 5 regioner efter de første 2 år med en prænatal genomisk RhD profylakse undersøgelse (1).

Serologisk RhD bestemmelse

I Danmark arbejdes der efter Transfusionsmedicinske Standarder (TMS) ved udførelsen af blodtypebestemmelser. Inden for rammerne af disse standarder vælger de enkelte laboratorier teknik og analyseudstyr. Derfor er der variation mellem de anvendte metoder på tværs af regionerne.

RhD blodtypebestemmelsen på gravide blev udført med direkte hæmagglutination i mikrotiterplader eller søjleagglutinationskort. Der opnås typisk højest sensitivitet med søjleagglutinationskort. Det anvendte anti-D reagens påviser ikke den partielle DVI type. Der er krav om en højere sensitivitet ved en RhD profylakse undersøgelse, og denne justeres med teknikken. Derfor blev der anvendt en indirekte antihumanglobulin teknik (IAT), såfremt den initiale direkte hæmagglutinationsundersøgelse var RhD negativ og/eller der allerede forelå en



Af Grethe Risum Krog
Bioanalytikerunderviser
Klinisk Immunologisk Afdeling,
Blodbanken
Rigshospitalet

prænatal RhD forudsigtelse, der var RhD negativ. IAT blev udført i mikrotiterplader eller søjleagglutinationskort, som i kombination med IAT har samme sensitivitet. Ved IAT blev anvendt et anti-D, der påviser de fleste D varianter inkl. den partielle DVI type.

Det blev anbefalet at give RhD profylakse til RhD negative kvinder med en RhD positiv nyfødt og ikke at give RhD profylakse til dem med en RhD negativ nyfødt.

Molekylærgenetisk *RHD* screening på cffDNA

Da *RHD* genet er meget polymorft, skal den del af genet, der påvises, udvælges nøje. Og jo flere områder af genet, der påvises, jo højere specificitet opnås der. Vi har valgt at kalde analysen en *RHD* screening, fordi man kun analyserer dele af genet. Når man arbejder med cffDNA, som findes i meget små mængder, helt ned til ét kopi af det ønskede gen pr. reaktion i en blanding med mater DNA, er det nødvendigt at anvende real-time PCR eller en anden lige så sensitiv teknik. Der er flere metoder på markedet til både oprensning af DNA og til real-time PCR.

På baggrund af udstyr og erfaring har de 5 regioner valgt deres metode til den prænatale RhD profylakseundersøgelse. I alle regioner blev der anvendt real-time PCR, og der blev påvist minimum 2 exons på *RHD* genet. Metoderne er beskrevet detaljeret af Clausen et al (1).

Jeg vil her tillade mig at lave en meget kort sammenfatning af den metode, vi anvendte (anvender) i Region H.

Alle analyser var automatiserede med elektronisk dataover-

førsel, dog ikke den endelige svarafgivelse. Fra RhD negative gravide i deres 25. graviditetsuge modtog vi, oftest med posten fra praktiserende læge, en blodprøve taget i 6 mL EDTA. Dato for blodprøvetagning blev registreret ved ankomsten. Prøven blev centrifugeret v 1700G i 10 min, og plasma blev tjekket for hæmolyse. Prøven blev anbragt på QIASymphony SP (Qiagen Inc., Basel, Switzerland), og DNA blev oprenset fra 1 mL plasma med QIASymphony DSP/Pathogen Midi kittet med carrier-RNA. DNA blev elueret i 60 µL. PCR reaktionen blev herefter afpipetteret på samme udstyr. DNA blev analyseret på real-time udstyret ABI 7500 (Applied BioSystems, Foster City, USA) med Taqman kemi. Reaktionsvolumenet var 25µL, og der blev anvendt Universal Master Mix med uracil-N-glycosylase (UNG) (Applied BioSystems).

Primer og prober målrettet *RHD* exon 7 og 10 blev anvendt i en duplexreaktion med begge prober mærket med FAM. Dette medfører, at der ikke kan skelnes mellem en reaktion med exon 7 og exon 10, ej heller mellem en reaktion med et eller begge exons. Til gengæld fordobles sensitiviteten, når begge exons er til stede, hvad de næsten altid vil være. Total DNA blev påvist med primer og probe målrettet genet for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*). Slutkoncentrationen af primerne var 900nM og af proberne 100nM.

DNA blev analyseret for *RHD* i triplikater med 10µL template pr reaktion og *GAPDH* i en enkelt reaktion med 5µL template. Der var altid kontroller på hver PCR plade med *RHD* positivt og *RHD* negativt DNA samt adskillige kontroller uden template.

Temperaturprofilen var 2 min ved 50°C og 10 min ved 95°C, >

Real-time PCR

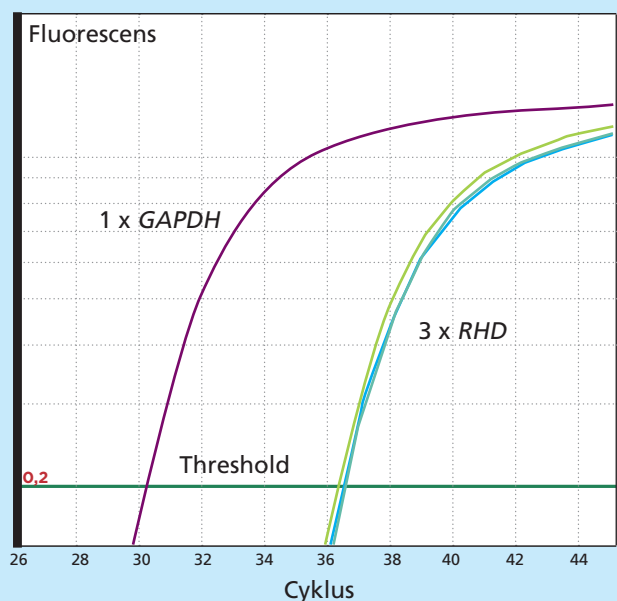
En PCR metode, hvor opformeringen af det ønskede PCR produkt, defineret ved de specifikke primere, kan følges pr. cyklus. Der findes flere teknikker. Den, vi anvender i Region H, er TaqMan. Ved hjælp af en probe mærket med en reporter (fluorescerende farvestof) i 5' og en quencher ("lyseslukker") i 3' aflæses mængden af PCR produkt pr. cyklus som fluorescens, når polymerasens exonuclease aktivitet adskiller reporteren fra quencheren.

I en PCR med optimal effektivitet vil der ske en fordobling af PCR produktet pr. cyklus.

En afgørende fordel ved Real-time PCR i forbindelse med opformering af meget få kopier DNA er den nedsatte kontaminerings risiko, fordi visualiseringen af PCR produktet sker i samme lukkede rør som opformeringen.

Nedfor ses et real-time PCR resultat visualiseret med ABI 7500 Systemets SDS software version 2.0.5 med anvendelse af en fast threshold på 0,2. Et resultat aflæses som den cyklus, hvor fluorescens signalet passerer threshold, som er grænseværdien mellem baggrund og et positivt signal (Ct-værdi).

Fig. 1 Amplifikations plot af DNA oprenset fra mater plasma



Total DNA = en kombination af mater DNA og foster DNA = *GAPDH*, som har en Ct-værdi på 30,1. Foster DNA = *RHD* har en Ct-værdi (median) på 36,3. Da der er tilsat dobbelt så meget template til reaktionen med *RHD* end til reaktionen med *GAPDH*, vil reaktionen med *RHD* passere threshold en Ct før *GAPDH*, derfor er forskellen i Ct-værdierne $36,3 - 1 - 30,1 = 7,2$. Det vil sige, at koncentrationen af foster DNA er ca $\frac{1}{2}^{7,2}$ (ca 1 %) af den totale mængde DNA.

➤ efterfulgt af 45 cykler med 95°C i 15 sec og 60°C i 1 min. Der blev anvendt fast threshold på 0,2 ved resultatbehandlingen.

En PCR reaktion blev konkluderet positiv, hvis *cycle of threshold* (Ct) værdien var større end 42. En prøve blev forudsagt til RhD positiv, hvis alle triplikater var positive, RhD negativ, hvis ingen eller en af triplikaterne var positiv og inkonklusiv, hvis to af reaktionerne var positive, eller hvis *RHD* Ct-værdien var mindre end eller lig med Ct-værdien af *GAPDH*. Hvis signalet fra *RHD* reaktionen og *GAPDH* reaktionen giver næsten samme Ct-værdi, indikerer dette, at mater er *RHD* positiv, hvilket medfører, at fosterets RhD type ikke kan forudsiges.

Det blev anbefalet at give RhD profylakse til RhD negative gravide ved forudsigelsen af et RhD positivt foster og til dem med et inkonklusivt svar. Det blev anbefalet ikke at give RhD profylakse til RhD negative gravide ved forudsigelsen af et RhD negativt foster.

Udredning af uoverensstemmende resultater

Den prænatale *RHD* screening blev evalueret ved at sammenligne den forudsagte RhD blodtype med den serologisk bestemte RhD blodtype, der blev udført på navlesnorsblod fra den nyfødte, idet denne betragtedes som den gyldne standard.

I tilfælde af uoverensstemmende resultater blev disse udredt så vidt muligt. Der blev suppleret med udvidede serologiske og molekylærgenetiske analyser. Se Clausen et al (1) for yderligere information.

Resultater

Der blev i Danmark på de to første år med prænatal *RHD* screening udført analyser på 12.668 gravide, hvor RhD blodtypebestemmelsen på den nyfødte efterfølgende blev udført. Af dem var 7.830 (61,8%) af de nyfødte RhD positive og 4.838 (38,2%) RhD negative. Sensitiviteten af *RHD* screeningen var 99,9%, og der var 0,087% falsk negative resultater. Se Tabel 1 for alle de samlede resultater. Detaljerede resultater for de enkelte regioner kan læses i artiklen af Clausen et al (1).

Der var 11 cases med et falsk negativt resultat (10 fra 23.-28. graviditetsuge og 1 allerede fra 8. graviditetsuge). Der var ikke registret hæmolyse i nogen prøver, og prøverne var mindre end 7 dage gamle (en enkelt var 8 dage). DNA oprensningen virkede til at have været tilfredsstillende, dog var der på en af prøverne en Ct-værdi for total DNA på 36,2, hvilket indikerer et meget lavt DNA udbytte.

Der var 41 cases med et falsk positivt resultat. Der blev identificeret forskellige årsager til falske positive resultater. Der var 14 prøver, hvor der sandsynligvis var sket en kontaminering eller forbytning af prøver. I 9 cases blev der påvist forskellige pseudo *RHD* gener af føtal oprindelse (pseudo genet giver ikke anledning til produktionen af et RhD protein). I 4 tilfælde var årsagen en maternal D variant. Der var observeret menneskelige håndteringsfejl i 4 tilfælde og menneskelige fejl ved besvarelsen af 3 analyser. I 7 tilfælde fandt man ikke nogen forklaring.

I 274 (2,2%) cases blev resultatet inkonklusivt på baggrund af følgende årsager. I 107 tilfælde var årsagen en maternal D variant, 92 gravide havde en svag D type, mens 14 havde en partiel DVI type. I 38 tilfælde blev der påvist et maternelt pseudo *RHD* gen. Af dem havde 8 *RHDΨ* genet, og 9 havde *RHD-CE(3-7)-D d(C)ces* genet, de hyppigste pseudo gener blandt folk med afrikansk afstamning, resten skyldes en blanding

Tabel 1 Resultater fra den prænatale *RHD* screening

DANMARK 2010 OG 2011 DATA FRA REGION 1-5	
Total antal <i>RHD</i> screening	14.547
<i>RHD</i> screening med serologisk postnatal RhD resultat	12.668
Sandt positive resultater	7.636
Sandt negative resultater	4.706
Falsk negative resultater	11
Falsk positive resultater	41
Inkonklusive resultater	274
Sensitivitet	99,86%
Specificitet	99,14%
Falsk negative resultater i %	0,087
Falsk positive resultater i %	0,324
Unødvendige rekommandationer af prænatal RhD profylakse (%)	132 (1,04)

Dansk oversættelse af Tabel 1 Clausen et al (1)

af andre pseudo gener bl.a. *RHD-CE(2-9)-D*, dCe, det hyppigste blandt europæere. I 13 cases var grunden et svagt PCR signal, og i andre 19 cases skyldtes det tekniske problemer. I 29 cases var der en meget høj baggrund af mater DNA. I 3 tilfælde fejltolkede man resultatet som en maternal *RHD* variant pga. en lav Ct-værdi for *RHD* reaktionen, men ved udredning af resultaterne påvises et højt niveau af cffDNA. I 65 cases fandt man ikke nogen forklaring.

Totalt undgik 4.706 kvinder at få unødvendig RhD profylakse, hvilket svarer til 97,3% af de RhD negative kvinder, der var gravide med et RhD negativt foster.

Diskussion

Med denne 2 års evaluering af prænatal foster *RHD* screening som klinisk implementeret rutineanalyse, har vi i Danmark vist, at det er en meget sikker metode at anvende som RhD profylakseundersøgelse. Vi har opnået en sensitivitet på 99,9%, og man ville nok heller ikke forvente en højere sensitivitet af den serologiske undersøgelse. Der var 0,087% falsk negative resultater, hvilket er lidt mindre end de resultater, der er opnået i andre studier. Man har dog i Holland for nylig beskrevet andelen af falsk negative resultater til 0,03% i et rutine sætning som det danske, udført på prøver fra uge 27. Årsagen til de falsk negative resultater blev ikke fundet, men menneskelige fejl kan ikke udelukkes. Hovedparten af sådanne fejl kan måske undgås i fremtiden, når alt er automatiseret fra prøvehåndtering til svarafgivelse. Enkelte procedurer blev ændret allerede efter et halvt år, efterhånden som vi fik erfaring og opdagede uhensigtsmæssigheder. Vi arbejder i Region H med at udvikle et fuldt automatiseret system, inkl. automatiseret konklusion og svarafgivelse.

Der var et forventeligt antal RhD varianter, der medførte, at kvinder blev tilbudt unødvendig RhD profylakse. Dette kan

ikke helt undgået, dels pga. uoverensstemmelse mellem den genomiske *RHD* bestemmelse og den serologiske RhD bestemmelse (falsk positive), dels fordi vi undersøger en prøve, der består af DNA fra to individer, både moder og foster (inkonklusive resultater). Uoverensstemmende resultater kan skyldes det, der hedder pseudo gener, der er et ikke-funktionelt *RHD* gen, der gør, at personen har blodtypen RhD negativ. I Region H har vi exon 10 med i vores analyse, og det er egentlig ikke så smart, fordi netop dette exon medfører en positiv reaktion med det hyppigste pseudo gen blandt europæere (ca. 1/2000). Til gengæld synes vi, at vores metode giver en forhøjet sensitivitet, og vi mener det klinisk vigtigste er at undgå falsk negative resultater. Mange af de inkonklusive resultater kan heller ikke undgåes, bl.a. fordi vi i Danmark anbefaler, at kvinder med den partielle DVI type skal have RhD profylakse, og deres blodtype er derfor bestemt som RhD negativ, selvom om de har et partielt RHD gen. Undervejs er der foretaget forskellige ændringer i besvarelsen, der har nedsat mængden af inkonklusive resultater fx havde man i starten ikke nok viden om betydningen af en høj baggrund af moder DNA og valgte derfor en forsigtig strategi og besvarede analyser med høj baggrund som inkonklusive. Et studie af fænomenet viste, at selvom baggrunden af moder DNA steg under opbevaringen af prøverne, influerede det ikke på analysens evne til at påvise foster DNA.

På trods af falsk positive og inkonklusive resultater betød anvendelse af en prænatal *RHD* screening, at vi kunne forhindre unødigt anbefaling af anti-D til 97,3% af de RhD negative kvinder, der var gravide med et RhD negativt foster, og som dermed ikke behøvede profylakse.

Der har været udført et *compliance* studie i Region N, som klart viste plads til forbedring. Ud af 690 RhD negative kvinder, hvoraf 330 blev anbefalet at få RhD profylakse, fik kun 78% både præ- og postnatal profylakse, 21% fik kun postnatal profylakse og 1% fik ingen profylakse. Risikoen for ikke at få profylakse var 16 gange højere uden en prænatal RhD profylakseundersøgelse. Se Clausen et al (1) for yderligere informationer. □

Referencer:

- 1 Clausen FB, Steffensen R, Christiansen M, Rudby M, Jakobsen MA, Jakobsen TR, Krog GR, Madsen RD, Nielsen KR, Rieneck K, Sprogøe U, Hamburg KM, Baech J, Dziegiel MH og Grunnet N. *Routine noninvasive prenatal screening for fetal RHD in plasma of RhD negative pregnant women – 2 years of screening experience from Denmark*. Prenatal Diagnosis 2014, 34, 1-6.
- 2 Larsen JF, Bock J.E., Jørgensen J.R.. *Forebyggelse af Rhesusimmunisering I og II*. Ugeskrift for Læger 166/36, 2004.
- 3 Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. *Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum*. Lancet 1997;350:485-87.
- 4 Lo YM, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, Poon PM, Redman CW, Wainscoat JS. *Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma*. N Engl J Med 98;339:1734-38.
- 5 Krog GR. *Prænatal RHD genotypebestemmelse*. Danske Bioanalytikere, 22, 12/2005.

RhD profylakseundersøgelsen

I daglig tale kalder vi bestemmelsen af fosterets og/eller den nyfødtes RhD blodtype for RhD profylakseundersøgelsen, fordi det er denne, der udløser RhD profylaksesvaret. En RhD profylakseundersøgelse består egentlig af flere analyser. I starten af graviditeten udføres der på den gravide en blodtypebestemmelse og en blodtypeantistofscreening. Såfremt der ikke bliver påvist blodtypeantistoffer, bliver der igen i 25. graviditetsuge (før 2010 i 36. uge) udført en blodtypeantistofscreening på RhD negative gravide, for at sikre at den gravide stadig ikke har udviklet anti-D, da det i så fald vil være uden virkning at give RhD profylakse. Herefter bestemmes fosterets RhD blodtype.

RhD profylakse

En intramuskulær indsprøjtning med et humant anti-D blodtypeantistof, der gives til RhD negative gravide/mødre med RhD positive fostre/nyfødte, for at forhindre at kvinden immuniseres til dannelse af anti-D. Dosis er sædvanligvis på 250-300 µg og dækker en blødning på 12 mL pakkede erythrocytter fra foster til moder (føtomaternel blødning).

RhD blodtypen

Nomenklatur:

Gen: *RHD* (kun store bogstaver i kursiv)

Protein: RhD (lille h)

Antigen: D (uden Rh foran)

Antistof: anti-D

RHD genet giver anledning til produktion af et RhD protein, der bærer D antigenerne, der kan immunisere til dannelse af et anti-D. Individer uden et RHD gen får blodtypen RhD negativ.

RhD blodtypen er den klinisk set næst vigtigste blodtype efter ABO blodtypen. Dette skyldes D antigenets høje immunogenicitet, dvs. evne til at stimulere til antistofdannelse ved transfusion af ganske små mængder RhD positive erythrocytter til en RhD negativ person. RhD blodtypen er styret af *RHD* genet, der er det ene af Rh systemets to tætkoblede gener. *RHD* genet består af 10 exons og er meget polymorft, dvs. findes i mange forskellige udgaver, der har mere eller mindre klinisk betydende mutationer. Det betyder, at RHD genet kan ændre sig kvalitativt, og derved kan D antigenet variere både kvalitativt (partielt D type, hvoraf DVI typen er hyppigst blandt europæere) og kvantitativt (svag D type), samlet kaldet D varianter. Man skal altså designe sine metoder med stor omhu, så man påviser nøjagtigt det, man ønsker at påvise. Hos bloddonorer (som også inkluderer fostre/nyfødte i forbindelse med RhD immunisering) skal enhver form for D antigen påvises og medføre et RhD positivt svar, mens man hos patienter og gravide bevidst undgår at påvise visse D antigen, da personer med disse RhD blodtyper kan immuniseres til dannelse af partielt anti-D.

For mere info om Rh systemet læs: R. Hansen. Rh blodtypesystemet.

Danske Bioanalytikere, 12, 02/2007