

Aus dem Institut Oldenburg
des DRK-Blutspendedienstes NSTOB

„Evaluierung eines neuartigen Verfahrens zur Extraktion zellfreier
DNA für die nichtinvasive Bestimmung fetaler Blutgruppenmerkmale
aus maternalem Blut“

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
in der Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von

Tomasz Adamczyk
aus Opole, Polen

Hannover 2017

Angenommen vom Senat: 29.08.2018

Präsident: Prof. Dr.med. Christopher Baum
Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr.rer.nat. Thomas Müller

1. Referent: Prof. Dr.med. Constantin von Kaisenberg
2. Referent: PD Dr.med. Hans-Gert Heuft

Tag der mündlichen Prüfung: 29.08.2018

Prüfungsausschuss

Vorsitz: Prof. Dr.med. Michael Klintschar
1. Prüfer: Prof. Dr.rer.nat. Armin Braun
2. Prüfer: Prof.in Dr.med. Annette Solveig Debertin

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	S. 4
1. EINLEITUNG	S. 5
1.1 Fetomaternale Blutgruppenunverträglichkeit: Pathophysiologie und Klinik	S. 5
1.2 Determinanten des Schweregrades der Alloimmunzytopenie	S. 6
1.3 Genetik von Blutgruppenmerkmalen am Beispiel des D-Antigen	S. 7
1.4 Management von Risikoschwangerschaften mit fetomaternaler Blutgruppeninkompatibilität	S. 8
1.5 Genotypisierung fetaler Blutgruppenmerkmale am Beispiel <i>RHD</i>	S. 8
1.6 Fragestellung	S. 10
2. ERGEBNISSE	S. 11
<p>Adamczyk, T., Doescher, A., Haydock, P.V., Aldrich, R., Petershofen, K., Müller, T.H. The glass slide extraction system Snap Card improves non-invasive prenatal genotyping in pregnancies with antibodies. <i>Transfusion Medicine and Hemotherapy</i> 2015; 42: 379-384</p>	
3. DISKUSSION	S. 12
4. ZUSAMMENFASSUNG	S. 16
5. LITERATURVERZEICHNIS	S. 17
ANHANG	
6. PUBLIKATION	S. 22
7. ERKLÄRUNG	S. 29
8. LEBENS LAUF	S. 30

Abkürzungsverzeichnis

BCSI Blood Cell Storage Incorporation, Seattle, WA, USA
Hersteller der SNAPTM-Karte

cfDNA zirkulierende freie Desoxyribonukleinsäure
(engl.: **c**irculating **f**ree **d**esoxyribonucleic **a**cid)

cffDNA zirkulierende freie fetale Desoxyribonukleinsäure
(engl.: **c**irculating **f**ree **f**etal **d**esoxyribonucleic **a**cid)

DNA Desoxyribonukleinsäure
(engl.: **d**esoxyribonucleic **a**cid)

ffDNA freie fetale Desoxyribonukleinsäure
(engl.: **f**ree **f**etal **d**esoxyribonucleic **a**cid)

HDF Morbus haemolyticus des Feten
(engl.: **h**emolytic **d**isease of the **f**etus)

HDN Morbus haemolyticus des Neugeborenen
(engl.: **h**emolytic **d**isease of the **n**ewborn)

MHN Morbus haemolyticus neonatorum

PCR Polymerase Kettenreaktion
(engl.: **p**olymerase **c**hain **r**eaction)

RASSF **R**as **a**ssociation domain **f**amily member

SNP Einzelnukleotid Polymorphismus
(engl.: **s**ingle **n**ucleotid **p**olymorphism)

SSW Schwangerschaftswoche

1. Einleitung

1.1 Fetomaternale Blutgruppenunverträglichkeit: Pathophysiologie und Klinik

Bei Alloimmunzytopenien kann das Überleben fetaler Blutzellen bereits in frühen Schwangerschaftsstadien erheblich beeinträchtigt sein. Durch den Übertritt fetaler Zellen in den mütterlichen Kreislauf kann das Immunsystem der Mutter gegen Merkmale des Kindes, die der Mutter fehlen, sensibilisiert werden. Sobald von der Mutter gebildete IgG - Antikörper gegen Antigene auf den Oberflächen fetaler Zellen die Plazentaschranke überwinden und im kindlichen Kreislauf zirkulieren, besteht die Gefahr, dass die mit den Antikörpern beladenen Zellen im kindlichen Blut beschleunigt eliminiert werden. Das bekannteste Beispiel für eine Alloimmunzytopenie ist der Morbus hemolyticus fetalis (MHF) beziehungsweise der Morbus hemolyticus neonatorum (MHN).

Levine und Mitarbeiter zeigten 1941 erstmals¹, dass Blutgruppenmerkmale für verschiedene Komplikationen von der Totgeburt bis zum Kernikterus beim Neugeborenen verantwortlich sein können. Der Schweregrad der klinischen Manifestationen derartiger Allimmunzytopenien variiert erheblich. Er reicht von leichten Anämien bis zu massiven Beeinträchtigungen. Schwerwiegende fetalen Anämien imponieren zunächst als Hepato- und Splenomegalie. Die Leber dient ab der 8. SSW als Hauptorgan der Erythropoese, die als Reaktion auf die Hämolyse meist deutlich stimuliert wird. Der beschleunigte Abbau der Antikörper-beladenen Erythrozyten erfolgt vorwiegend im retikulo-endothelialen System der Milz. Hydrops fetalis mit Ödemen und Aszitesbildung sowie Pleura-oder Perikardergüssen treten bei exzessiven fetalen Anämien auf.

Selbst in den Fällen mit weniger ausgeprägter Hämolyse vor der Geburt können bei Neugeborenen (MHN) bereits niedrigere Bilirubinkonzentrationen im Blut die sich erst entwickelnden Kapazität der Leber zur Konjugation des Bilirubins überfordern, so dass die Konzentration des freien Bilirubins im Blut toxische Werte erreichen kann. Das Bilirubin reichert sich in Nervenzellen an (Kernikterus) und hinterlässt bei den wenigen überlebenden Neugeborenen katastrophale neurologische Langzeitschäden.

In dem Maße, wie die mütterlichen Antikörper nach der Geburt aus dem kindlichen Kreislauf verschwinden, erholt sich das Kind und es kann sich im Anschluß, soweit keine irreversiblen Schäden eingetreten sind, völlig normal entwickeln.

1.2 Determinanten des Schweregrades der Alloimmunzytopenie

Welche Faktoren das Ausmaß der Bedrohung des kindlichen Organismus durch die Alloimmunisierung der Mutter im Rahmen feto-maternaler Blutgruppeninkompatibilität bestimmen, ist bisher nur wenig verstanden.

Die naheliegende Überlegung, dass die absolute Zahl der Antigen-Trägermoleküle auf der Zelloberfläche von Bedeutung sein könnte, hat sich nicht bestätigt.

Auf der Oberfläche von Erythrozyten dominieren mit rund 1 Million Molekülen pro Zelle die AB0-Merkmale, der Anion-Austauscher 1 (Diego Merkmal) und das Glycophorin A (MN-Antigene).

Deutlich schwächer vertreten sind die D-Antigene (mit ca 100.000 Molekülen/Zelle) und das Kell-Antigen (mit ca. 1000 Moleküle/Zelle). Dennoch sind diese beiden Antigene die wesentlichen Auslöser von schwerwiegenden Manifestationen eines MHF/MHN.

Die ausgeprägte Immunogenität des D-Merkmals könnte mit der Struktur des Proteins, das das D-Antigen repräsentiert, zusammenhängen. In der Zellmembran der Erythrozyten D-positiver Individuen ist das RhD-Protein als integrales Membranprotein verankert. Die Polypeptidkette des (416 Aminosäuren umfassenden) RhD-Proteins durchquert die Zellmembran zwölfmal und präsentiert mit seinen 6 extrazellulären Schleifen rund 80 Aminosäuren direkt an der Oberfläche der Zellmembran. Das komplette Fehlen eines antithetischen Antigens bei D-Negativen kann die beeindruckende Immunogenität des D-Proteins erklären.

Obwohl auch andere Antikörper des Rh-Systems (anti-C, anti-E, anti-e, anti-G) als Auslöser von MHF/MHN beschrieben sind, ist ihre Bedeutung aufgrund der Seltenheit und der wenig bedrohlichen Verläufe gering.

Neben dem D-Antigen spielt das K-Merkmal für Alloimmunisierungen in der Schwangerschaft eine bedeutende Rolle. Antikörper gegen das K-Antigen können sehr ausgeprägte und rasante MHF-Verläufe in Gang setzen. Ein einfacher Austausch der Aminosäure Threonin durch Methionin in Position 193 des Kell-Glykoprotein der Erythrozytenmembran generiert das K-Antigen. Da diese Substitution die Konsensussequenz für die N-Glykosylierung des Proteins unterbricht, bietet die zu erwartende Auswirkung auf die Glykosylierung des Membranproteins eine plausible Erklärung für die starke Immunigenität des K-Antigens.

Die klinische Relevanz von K-Antikörpern mit zum Teil dramatischen MHF-Verläufen dürfte auch mit der ausgeprägten Unterdrückung der Erythropoiese durch anti-K zusammenhängen, die aus Zellkulturuntersuchungen beschrieben ist².

Relativ häufig (bei 15% Schwangerer in Europa) tritt Risikokonstellation einer Mutter mit der Blutgruppe 0 mit Feten der Blutgruppe A oder B auf. Obwohl die Isoagglutinine anti-A, anti-B und anti-A,B häufig Immunglobuline der Klasse IgG umfassen und Placenta-gängig sind, gehören schwerwiegende Verläufe eines MHF/MHN mit dieser ABO-Inkompatibilität zu sehr seltenen Ausnahmen. Sowohl die relativ geringe Dichte der ABO-Antigene auf den fetalen Erythrozyten als auch die Gegenwart löslicher A- oder B-Antigene im fetalen Plasma bieten plausible Erklärungen für diese Diskrepanzen.

1.3 Genetik von Blutgruppenmerkmalen am Beispiel des D-Antigen

Antigene, wie D im Rh-System, werden üblicherweise dominant vererbt. Der D-negative Phänotyp (Fehlen des D-Antigens) wird rezessiv an die Folgegeneration weitergegeben.

Rund 12% bis 18% der Kaukasier sind für das Merkmal D des Rh-Blutgruppensystems negativ und können gegen das D-Antigen immunisiert werden. Der Anteil D-negativer Individuen liegt bei Afrikaner zwischen 2% und 5% und beträgt bei Asiaten weniger als 1%.

Für D-negative Mütter hängt die Wahrscheinlichkeit einer D-Inkompatibilität bei der Schwangerschaft vom D-Genotyp des Vaters ab.

Bei einem Vater der homozygot für D ist, ist stets ein D-positiver Phänotyp für das Kind zu erwarten. Bei einem heterozygoten *RHD*-Genotyp des Vaters beträgt die Wahrscheinlichkeit 50%, dass das *RH*-Gen vom Vater an das Kind nicht weitergegeben wird. In der Konstellation, dass weder Mutter noch Vater das *RHD*-Gen an das Kind vererben, werden die kindlichen Zellen das D-Merkmal nicht tragen und entsprechend wird kein Risiko für ein D-Merkmal bedingtes Risiko von MHF/MHN bestehen.

Dieser übersichtliche Erbgang wird im Detail durch zahlreiche *RHD*-Allele kompliziert, bei denen die Expression des D-Merkmals auf den Erythrozyten abgeschwächt ist^{3,4} oder Teile des D-Proteins gar nicht exprimiert werden⁵.

1.4 Management von Risikoschwangerschaften mit fetomaternaler Blutgruppeninkompatibilität

Idealerweise sollte versucht werden, die Alloimmunisierung der Mutter zu verhindern. Neben der Beachtung der Rh-Blutgruppenmerkmale bei der Hämotherapie von Frauen im gebärfähigen Alter gehört dazu auch die konsequente D-Immuno prophylaxe im Rahmen von Schwangerschaften D-negativer Frauen. Die Prophylaxe hat sich in Regionen mit gut entwickelten Gesundheitssystemen seit Jahrzehnten als sehr effektiv bewährt, so dass MHF oder MHN nur noch sehr selten auftreten. Migrantinnen aus Osteuropa (15-17% der kaukasischen Bevölkerung in Europa ist D-negativ), arabischen Ländern (ca. 10% D-negative Frauen) oder afrikanischen Ursprungs (ca. 5% D-negative Frauen) tragen wesentlich dazu bei, dass Schwangerschaften mit einer Alloimmunisierung gegen das D-Merkmal in Deutschland zunehmen.

Die in den 1980ern entwickelte Möglichkeit, mittels Ultraschalluntersuchung die fetale und plazentare Entwicklung in der Schwangerschaft zu verfolgen, hat faszinierende Optionen zur Diagnose^{6,7} und Therapie bei MHF erschlossen. Geschickte Punktion der Nabelschnurvene vorzugsweise im Bereich des plazentaren Nabelschnuransatz unter Ultraschallkontrolle erlaubt, nicht nur eine fetale Blutprobe zu entnehmen sondern auch Erythrozyten wiederholt bedarfsgerecht intrauterin zu transfundieren⁸⁻¹⁰.

Für ein optimales Management dieser vorübergehenden Bedrohung des Kindes ist es hilfreich, möglichst frühzeitig festzustellen, ob überhaupt die Risikokonstellation einer fetomaternalen Blutgruppeninkompatibilität im Rahmen der aktuellen Schwangerschaft gegeben ist. Ist eine Risikokonstellation gesichert, helfen regelmäßige Ultraschallkontrollen und gegebenenfalls intrauterine Erythrozytentransfusionen, das Kind durch diese bedrohliche Phase zu führen.

1.5 Genotypisierung fetaler Blutgruppenmerkmale am Beispiel RHD

Pränatale Untersuchungen des *RHD*-Status mittels PCR wurden erstmals 1993 beschrieben¹¹. Bei D-positiven Individuen umfasst der *RH*-Locus auf dem kurzen Arm des Chromosom 1 (p36.13-p34.3) die beiden Gene *RHCE* und *RHD*, die hochgradig homolog jeweils aus 10 Exons bestehen (Abb.1A). Der *RH*-Genort D-Positiver wird aus einer „upstream Rh box“, dem *RHD*-Gen, gefolgt von der „downstream Rh box“, *SMP1*-Gen mit unbekannter Funktion sowie dem *RHCE*-Gen gebildet^{12,13}. Dieser Aufbau legt nahe, dass

sich durch Verdoppelung des ursprünglichen *RH*-Gens die beiden Gene *RHD* und *RHCE* entwickelt haben.

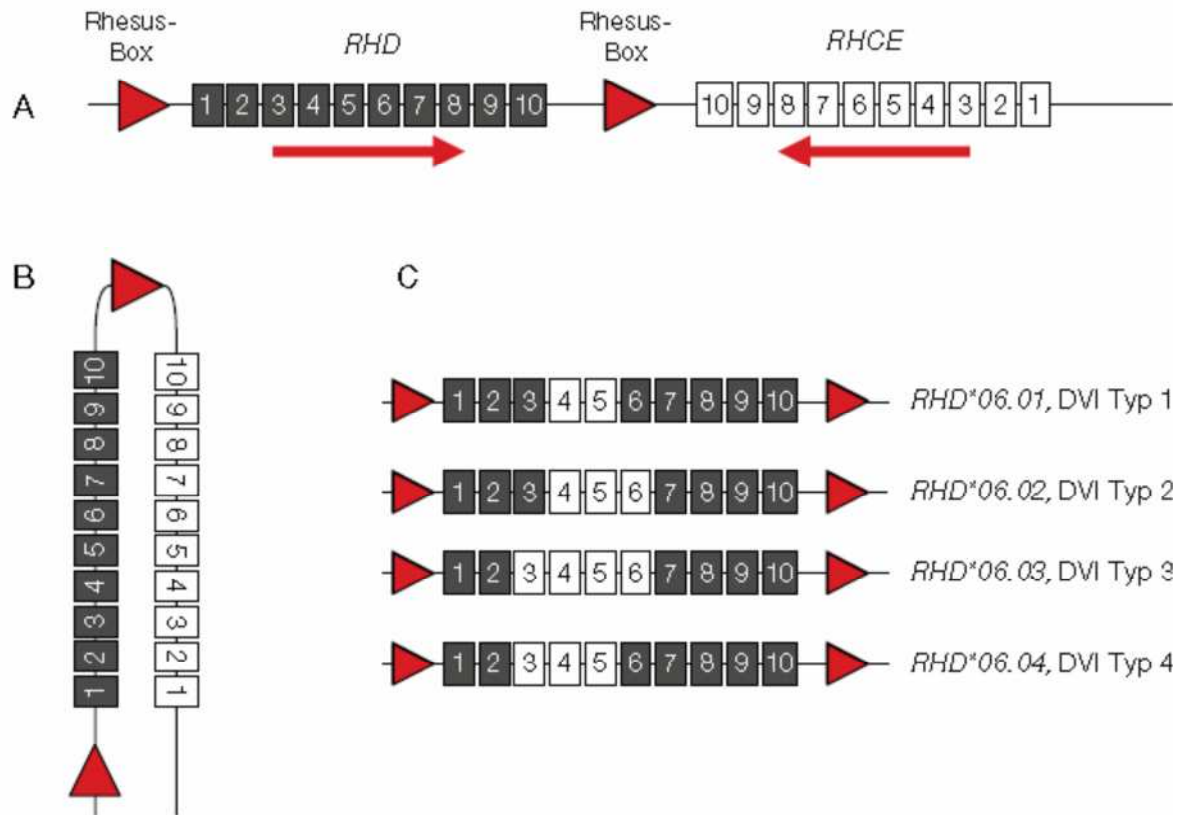


Abb. 1: Aufbau des RH-Genortes (A), Genkonversion (B) führt zu *RHD-CE-D* Hybridgenen (C); schematische Darstellung von F.F. Wagner^{12,13}

Im Unterschied zur üblicherweise gleichen Orientierung von duplizierten Genen als „Tandem“ liegen sich die beiden Gene *RHD* und *RHCE* in einer End-zu-End Position gegenüber. Aufgrund dieser Clusterstruktur kann eine Aneinanderlagerung beider Gene zum Austausch homologer Genabschnitte führen (Abb. 1B). Werden beispielsweise die Exons 3-6 des *RHD*-Gens durch die entsprechenden Abschnitte des *RHCE*-Gens ersetzt, entsteht ein *RHD-CE(3-6)-D* Hybridgen, das den Phänotyp einer D-Kategorie VI – Typ 3 kodiert (Abb. 1C). Individuen mit diesem Phänotyp sind D-positiv und können dennoch gegen von Exon 3-6 kodierte Segmente des D-Proteins Antikörper entwickeln. Diese klinisch relevanten Varianten können zu Fehlinterpretationen bei der *RHD*-Genotypisierung führen. Deshalb sollten mindestens zwei entfernte Regionen der *RH*-Gene für eine korrekte *RHD*-Genotypisierung untersucht werden.

Bei Kaukasiern fehlt D-negativen Individuen das *RHD*-Gen. Die Mehrheit D-negativer Afrikaner weisen anstelle des deletierten *RHD* das *RHD*-Pseudogen *RHD ψ* auf¹⁴, das aufgrund mehrerer Mutationen nicht transkribiert wird.

Lange Zeit standen nur invasive Techniken zum Nachweis einer entsprechenden Risikokonstellation zur Verfügung. Chorionzottenbiopsie oder Amniozentese bieten zwar eine aussagekräftige Diagnostik bereits in dem ersten Trimenon der Schwangerschaft. Sie gehen allerdings mit einem relevanten Abortrisiko von bis zu ca. 1% der Eingriffe einher (bei sehr erfahrenen Untersuchern eher von ca. 0,2%).

Erst 1997 konnte die Arbeitsgruppe von Lo et al. zeigen, dass im Plasma und Serum der Schwangeren freie fetale DNA (ffDNA) vorliegt¹⁵. Diese Beobachtung hat unter anderem die Möglichkeit zur Genotypisierung fetaler Blutgruppenmerkmale aus mütterlichem Blut eröffnet. In zahlreichen Publikationen^{11,15-49} ist die Anwendbarkeit dieser Methodik gezeigt worden, wobei sich die Mehrzahl der Arbeitsgruppen auf den Nachweis des fetalen *RHD* Gens fokussiert hat.

Weiterführende Untersuchungen von Lo et al.¹⁶ belegen die Abhängigkeit der Konzentration freier fetaler DNA im Blut der Mutter vom Gestationsalter: je weiter die Schwangerschaft fortgeschritten ist, desto höher ist die Konzentration der ffDNA. Zum sicheren Ausschluß einer Risikokonstellation bereits in einem frühen Stadium der Schwangerschaft ist ein eindeutiger Nachweis einer ausreichend hohen Konzentration von ffDNA notwendig, damit ein negativer Befund für das kritische Blutgruppenmerkmal valide interpretiert und auf ein weiteres engmaschiges Anämie-Monitoring beim Feten verzichtet werden kann.

1.6 Fragestellung

In der nicht-invasiven pränatalen Diagnostik wird als interne Kontrolle für das Vorhandensein ffDNA die Möglichkeit genutzt, bei männlichen Feten spezifische Sequenzen (z.B. SRY, AMEL) für das Y-Chromosom nachzuweisen. Die Implementierung einer internen Kontrolle bei weiblichen Feten ist ungleich schwieriger. Der Nachweis von Insertionen/Deletionen, einzelnen SNPs oder des RASSF-Gens kommen dafür in Frage. Erfolgskritisch für den möglichst frühzeitigen Nachweis oder Ausschluß einer fetomaternalen Blutgruppeninkompatibilität ist dabei auch die Leistungsfähigkeit des Verfahrens zur DNA-Isolierung. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb ein neuartiges Extraktionsverfahren mittels SNAP-Card zur möglichst effizienten Anreicherung von ffDNA aus mütterlichem Blut eingehend mit dem etablierten Verfahren verglichen werden.

2. ERGEBNISSE

The Glass Slide Extraction System Snap Card Improves Non-Invasive Prenatal Genotyping in Pregnancies with Antibodies

Thomasz Adamczyk^a Andrea Doescher^b Paul V. Haydock^c Russ Aldrich^c
Eduard K. Petershofen^b Thomas H. Müller^d

^aMedical Hospital 'Links der Weser', Gesundheit Nord, Department Internal Medicine, Bremen, Germany;

^bGerman Red Cross Blood Transfusion Service NSTOB, Institute Oldenburg, Germany;

^cBlood Cell Storage, Inc., Seattle, WA, USA;

^dGerman Red Cross Blood Transfusion Service NSTOB, Institute Springe, Germany

Transfusion Medicine and Hemotherapy 2015: 42:379-384

Thomas Adamczyk war an dem Design der Studie beteiligt, hat die Experimente durchgeführt und die Ergebnisse ausgewertet,

Andrea Doescher hat die Sammlung der Proben organisiert, die Studie mitgeplant, die Durchführung betreut und das Manuskript der Publikation erstellt,

Paul V. Haydock und Russ Aldrich haben ihre Erfahrungen bei der Entwicklung der SNAP-Karte in die Planung und Durchführung der Studie eingebracht,

Eduard K. Petershofen hat die Sammlung der Proben mitorganisiert,

Thomas H. Müller hat an dem Studiendesign, der Auswertung der Ergebnisse und der Erstellung des Manuskriptes mitgewirkt.

3. DISKUSSION

Für eine nicht-invasive pränatale *RHD*-Genotypisierung ist die real-time PCR die am häufigsten genutzte Methode, da die Technologie auf der Amplifikation kleiner DNA-Fragmente (100-200 Basenpaare) beruht und daher besonders für die stark fragmentierte freie fetale DNA geeignet ist. Der Einsatz fluoreszenzmarkierter Sonden ermöglicht die direkte Identifizierung der Amplifikate mit einer hohen Sensitivität. Wird gleichzeitig eine zweite Fluoreszenzfarbe in einem Multiplex-Ansatz integriert, kann neben der *RHD*-Sequenz ein weiteres Gensegment als interne Kontrolle detektiert werden, wie beispielsweise die bereits erwähnten Y Chromosom-spezifischen Sequenzen.

Das deutsche Gendiagnostikgesetz fordert bei der Untersuchung einer väterlichen Probe die Einverständniserklärung zur genetischen Untersuchung und eine anschließende humangenetische Beratung. Begründet ist der Beratungsbedarf bei der gemeinsamen molekulargenetischen Bearbeitung von maternaler, paternaler und fetaler DNA durch die Zuordnung dieser Untersuchung in das Fachgebiet der Abstammungsbegutachtung. Aus diesem Grund wurde für die vorliegende Arbeit eine Methode eingesetzt, die mit 52 verschiedenen SNPs als interne Kontrolle arbeitet⁴⁸. Bei diesem Ansatz wird die DNA aus mütterlichen Leukozyten mit der DNA aus dem Plasma hinsichtlich der SNP-Verteilung verglichen, ohne dass eine paternale DNA-Probe nötig ist. Die Untersuchung erfolgt in vier separaten PCR-Ansätzen, auf die sowohl die 52 SNPs als auch die notwendigen Primer und Sonden für vier verschiedene *RHD*-Bereiche verteilt sind (Exon 3, 4, 5 und 7).

Die Aussagekraft einer nicht-invasiven pränatalen *RHD*-Genotypisierung hängt nicht allein von den analytischen Qualitäten der verwendeten Nachweisverfahren sondern auch ganz wesentlich von der Leistungsfähigkeit der DNA-Extraktion ab. Deshalb wurde das neu entwickelte SNAP-Card Verfahren an identischen Proben direkt mit der Standardmethode der DNA-Anreicherung an magnetische Partikel (MagnaPure) anhand der Analytik einer repräsentativen Sammlung von 281 Schwangeren verglichen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Kombination von DNA isoliert mit der SNAP-Karte und dem SNP-Assay ein besonders sensitives Werkzeug für die nichtinvasive Diagnostik von Risikoschwangerschaften ist.

Für eine nicht-invasive pränatale Diagnostik bei Schwangerschaften mit einer Risikokonstellation bzw. vorhandenen Antikörpern bedarf es einer vernünftigen Strategie, die sowohl die Richtigkeit der Ergebnisse als auch den Aufwand der Untersuchungen berücksichtigt.

Laut statistischem Bundesamt wurden in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 2014 insgesamt 714.927 Kinder geboren: 366.835 Jungen und 348.092 Mädchen⁵⁰. Wie bereits erwähnt ist die nicht-invasive pränatale *RHD*-Diagnostik bei männlichen Feten durch die Inklusion einer Y-spezifischen Kontrolle in der real-time PCR gut abgesichert. Deshalb war es das Ziel der vorliegenden Untersuchung, ein Verfahren zur nichtinvasiven Pränataldiagnostik auch für Schwangerschaften mit einem weiblichen Feten zu optimieren.

Für eine kaukasische Population wird eine Verteilung von 55% RhD-positiven und 45% RhD-negativen Individuen angenommen, dementsprechend entfallen 156.641 Geburten auf RhD-negative Mütter. Wird diese Verteilung auch für die Kinder erwartet, so verbleiben rund 70.500 Schwangerschaften in der Kombination einer RhD-negativen Mutter und einem RhD-negativen (weiblichen) Feten beziehungsweise rund 86.150 Schwangerschaften in der Konstellation RhD-negative Schwangere und RhD-positiver Fetus.

Nicht alle dieser Schwangerschaften implizieren eine Risikokonstellation. Daten zur Prävalenz von anti-D-Antikörpern weisen eine Größenordnung von 1% auf, was berechnet auf die Zahlen aus dem Jahr 2014 ungefähr 700 Risiko-Schwangerschaften entspricht^{51,52}. Nur für diese Gruppe ist ein Ansatz der *RHD*-Genotypisierung mit einer internen Kontrolle für das Vorhandensein von *ffDNA* sinnvoll. Ein Untersuchungspfad zur nicht-invasiven pränatalen *RHD*-Bestimmung ist demnach der initiale Einsatz der real-time PCR, die entweder

- a) auf einen *RHD*-positiven Feten hinweist (männlich und/oder weiblich)
- b) einen *RHD*-negativen männlichen Feten erkennt oder
- c) im Falle eines *RHD*-negativen weiblichen Feten ein nicht-interpretierbares Ergebnis aufweist.

Erst danach und nur im Fall des unter c) aufgeführten Ergebnisses ist eine weitergehende Diagnostik mit einer geschlechtsunabhängigen internen Kontrolle erforderlich.

Trotz Rh-Prophylaxe sind allo-Antikörper gegen das RhD Antigen der häufigste Risikofaktor in Schwangerschaften RhD-negativer Frauen. Bei der Untersuchung von 419 Schwangerschaften mit einem positiven Antikörperscreening wiesen 222 Frauen einen anti-D-Antikörper auf, gefolgt von anti-K (n=55), anti-E (n=51) und anti-c (n=38). Die verbliebenen 53 Fälle bildeten eine inhomogene Gruppe aus anti-s, anti-Jk, anti-M und anti-C Antikörpern (unpublizierte Daten).

Die vorliegende Arbeit adressiert die Herausforderungen des nicht-invasiven RHD Nachweises bei Feten als begleitende Diagnostik für Schwangerschaften mit allo-Antikörpern gegen das RhD-Antigen. Ein weiteres Beispiel für die Anwendung dieser molekularbiologischen Pränataldiagnostik ist die gezielte Indikationsstellung für die pränatale Rh-Prophylaxe. Bei dieser Anwendung wird der weltweiten zunehmenden Verknappung von Anti-D Immunglobulin Präparaten Rechnung getragen. Sie hilft auch Risiken der Immunprophylaxe zu vermeiden. Diese beiden Anwendungen der Pränataldiagnostik unterscheiden sich wesentlich im Zeitpunkt der Probennahme. Für Schwangerschaften mit allo-Antikörpern dient ein möglichst früher Zeitpunkt in der Schwangerschaft (ca. 9. – 15. SSW) für die Risikoabschätzung seitens der behandelnden Gynäkologen. Die Entscheidung über die Gabe der Rh-Prophylaxe muss üblicherweise erst zwischen der 20. – 29. SSW getroffen werden. Der Gehalt an freier fetaler DNA im Blut der Schwangeren steigt mit zunehmender Schwangerschaftsdauer an. Er erreicht die höchsten Werte zwischen der 20. und 29. SSW.

Bislang wurde der Einsatz der pränatalen RHD-Genotypisierung aus mütterlichem Blut nur zur Beurteilung der Notwendigkeit einer Rh-Prophylaxe angemessen in klinischen Studien evaluiert.

Eine entsprechend umfangreiche prospektive Studie zu dieser Fragestellung wurde vom National Health Service in England durchgeführt³⁵. Dabei wurden Blutproben von 1997 RhD-negativen Frauen in der 28. (8. – 38.) SSW gewonnen. Mehr als 90% der Untersuchungsproben stammten aus der 26. bis 32. SSW. Bei 1805 Entbindungen in diesem Kollektiv konnte die Nabelschnur asserviert und der RhD-Serotyp der Neugeborenen bestimmt werden. Die Ergebnisse der serologischen und der molekularbiologischen Diagnostik sind in der folgenden 4-Feldertafel zusammengestellt. Das Ergebnis der Genotypisierung war bei 3,4% der Untersuchungsproben nicht beurteilbar. Dieser Anteil ist in der 4-Feldertafel nicht erfasst.

		Serotyp		
		D-positiv	D-negativ	
Genotyp	D-positiv	1118	14	
	D-negativ	3	670	
		1121	684	1805.

Bei 1788 von insgesamt 1805 auswertbaren Proben, d.h. bei 99,1% der Untersuchungen, stimmten die Ergebnisse der serologischen mit der molekularbiologischen Diagnostik überein. Der Anteil der falsch-positiven Genotypisierungen lag bei 0,78%, der falsch-negativer Ergebnisse bei 0,17%. Die Sensitivität der Genotypisierung im Vergleich zur Serologie als Goldstandard erreichte 99,7% und die Spezifität 98,0%. Insgesamt bewerteten die Autoren die Sensitivität und die Spezifität der nicht-invasiven RHD-Genotypisierung als vertretbar. Sie schlußfolgerten, dass dank dieser Diagnostik ca. 38% der RhD-negativen Schwangeren eine nicht notwendige RhD-Prophylaxe erspart werden konnte.

Wie bereits betont ist die pränatale RHD-Diagnostik aus maternalem Blut in früheren Stadien der Schwangerschaft insbesondere vor der 20. SSW aufgrund der sehr geringen Mengen fetaler DNA analytisch noch anspruchsvoller und die Ergebnisse der englischen Studie können nicht einfach auf diese Fragestellung übertragen werden. Leider ist es derzeit in Deutschland (auch aufgrund der Datenschutzbestimmungen) sehr schwierig entsprechende Daten systematisch zu erheben, da die Risikoschwangerschaften initial an spezialisierten Pränatalzentren betreut werden und die Entbindung nicht selten in anderen Kliniken erfolgt.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Fetomaternale Blutgruppeninkompatibilitäten können anhand der Genotypisierung fetaler DNA aus mütterlichem Blut bereits in frühen Stadien der Schwangerschaft erkannt werden, so dass Risikoschwangerschaften entsprechend begleitet und die Risiken für das Kind minimiert werden können.

Wesentliche Voraussetzung für die Genotypisierung ist ein zuverlässiger Nachweis fetaler DNA in dem Blut der Mutter. Somit ist die Isolierung der zellfreien DNA aus dem mütterlichen Blut von besonderer Bedeutung für die diagnostische Aussagekraft der nichtinvasiven Diagnostik. In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA -Extraktion mittels eines neuartigen Verfahrens durch die Bindung an die Glassoberfläche im Kapillarsystem der SNAPTM-Karte mit dem Standardverfahren unter Verwendung von Magnetkügelchen (MagnaPure compactTM) aus identischem Probenmaterial direkt miteinander verglichen. Bei mütterlichen Blutproben von 281 Schwangerschaften (7. bis 39. Schwangerschaftswoche) mit Antikörpern gegen Blutgruppenmerkmale wurden die beiden Verfahren angewendet, um die DNA-Konzentration im Extrakt, die Reinheit der DNA und die Nachweisbarkeit fetaler Merkmale in zwei PCR Systemen (Einzelbasenverlängerung zum Nachweis von informativen Einzelnukleotidpolymorphismen SNPs, RHD-Nachweis mittels real-time PCR) zu ermitteln.

Die Extraktion mit der SNAP-Karte liefert im Durchschnitt mit 33,8 ng DNA/ μ L deutliche höhere DNA-Gehalte im Extrakt als das MagnaPure-Verfahren mit 15,7 ng DNA/ μ L und reinere Präparationen. Für die Extrakte aus der SNAP-Karte waren im Mittel 3,7 informative Polymorphismen (SNPs) durch Basenverlängerung in der PCR nachweisbar. Die mittels MagnaPure gewonnen Extrakte ließen im Mittel nur 2,5 informative SNPs bei der PCR erkennen.

Mit diesen Qualitäten verbessert die Extraktion mit dem SNAP-Kartensystem die Leistungsfähigkeit nichtinvasiver Genotypisierung fetaler Blutgruppenmerkmale aus Blutproben der Mutter und bietet ein wertvolles Werkzeug zur Erkennung von Risikokonstellationen in frühen Stadien der Schwangerschaft.

5. LITERATURVERZEICHNIS

1. Levine P, Vogel P, Katzin EM, Burnham L. Pathogenesis of Erythroblastosis Fetalis: Statistical Evidence. *Science* 1941;94:371-2.
2. Vaughan JI, Manning M, Warwick RM, Letsky EA, Murray NA, Roberts IA. Inhibition of erythroid progenitor cells by anti-Kell antibodies in fetal alloimmune anemia. *N Engl J Med* 1998;338:798-803.
3. Müller TH, Wagner FF, Trockenbacher A, Eicher NI, Flegel WA, Schonitzer D, Schunter F, Gassner C. PCR screening for common weak D types shows different distributions in three Central European populations. *Transfusion* 2001;41:45-52.
4. Wagner FF, Gassner C, Müller TH, Schonitzer D, Schunter F, Flegel WA. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood* 1999;93:385-93.
5. Flegel WA, Wagner FF, Müller TH, Gassner C. Rh phenotype prediction by DNA typing and its application to practice. *Transfus Med* 1998;8:281-302.
6. Chitkara U, Wilkins I, Lynch L, Mehalek K, Berkowitz RL. The role of sonography in assessing severity of fetal anemia in Rh- and Kell-isoimmunized pregnancies. *Obstet Gynecol* 1988;71:393-8.
7. Daffos F, Capella-Pavlovsky M, Forestier F. Fetal blood sampling during pregnancy with use of a needle guided by ultrasound: a study of 606 consecutive cases. *Am J Obstet Gynecol* 1985;153:655-60.
8. Bang J, Bock JE, Trolle D. Ultrasound-guided fetal intravenous transfusion for severe rhesus haemolytic disease. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1982;284:373-4.
9. Rodeck CH, Kemp JR, Holman CA, Whitmore DN, Karnicki J, Austin MA. Direct intravascular fetal blood transfusion by fetoscopy in severe Rhesus isoimmunisation. *Lancet* 1981;1:625-7.
10. Seeds JW, Bowes WA, Jr. Ultrasound-guided fetal intravascular transfusion in severe rhesus immunization. *Am J Obstet Gynecol* 1986;154:1105-7.
11. Bennett PR, Le Van Kim C, Colin Y, Warwick RM, Cherif-Zahar B, Fisk NM, Cartron JP. Prenatal determination of fetal RhD type by DNA amplification. *N Engl J Med* 1993;329:607-10.
12. Wagner FF, Flegel WA. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood* 2000;95:3662-8.
13. Wagner FF, Flegel WA. RHCE represents the ancestral RH position, while RHD is the duplicated gene. *Blood* 2002;99:2272-3.
14. Singleton BK, Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E, Daka A, Narter-Olaga EG, Hawthorne LM, Daniels G. The presence of an RHD pseudogene containing a 37

- base pair duplication and a nonsense mutation in africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood* 2000;95:12-8.
15. Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CWG, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *The Lancet* 1997;350:485-7.
 16. Lo YM, Tein, M. S., Lau, T. K., Haines, C. J., Leung, T. N., Poon, P. M., Wainscoat, J. S., Johnson, P. J., Chang, A. M., Hjelm, N. M. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998;62:768-75.
 17. Bischoff FZ, Nguyen DD, Marquez-Do D, Moise KJ, Jr., Simpson JL, Elias S. Noninvasive determination of fetal RhD status using fetal DNA in maternal serum and PCR. *J Soc Gynecol Investig* 1999;6:64-9.
 18. Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. Detection of fetal Rhesus D and sex using fetal DNA from maternal plasma by multiplex polymerase chain reaction. *BJOG* 2000;107:766-9.
 19. Nelson M, Eagle C, Langshaw M, Popp H, Kronenberg H. Genotyping fetal DNA by non-invasive means: extraction from maternal plasma. *Vox Sanguinis* 2001;80:112-6.
 20. Finning KM, Martin PG, Soothill PW, Avent ND. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion* 2002;42:1079-85.
 21. Randen I, Hauge R, Kjeldsen-Kragh J, Fagerhol MK. Prenatal genotyping of RHD and SRY using maternal blood. *Vox Sanguinis* 2003;85:300-6.
 22. Turner MJ, Martin CM, O'Leary JJ. Detection of fetal Rhesus D gene in whole blood of women booking for routine antenatal care. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;108:29-32.
 23. Rijnders RJ, Christiaens GC, Bossers B, van der Smagt JJ, van der Schoot CE, de Haas M. Clinical applications of cell-free fetal DNA from maternal plasma. *Obstet Gynecol* 2004;103:157-64.
 24. Brojer E, Żupanska B, Guz K, Orzińska A, Kalińska A. Noninvasive determination of fetal RHD status by examination of cell-free DNA in maternal plasma. *Transfusion* 2005;45:1473-80.
 25. Clausen FB, Krog GR, Rieneck K, Nielsen LK, Lundquist R, Finning K, Dickmeiss E, Hedegaard M, Dziegiel MH. Reliable test for prenatal prediction of fetal RhD type using maternal plasma from RhD negative women. *Prenatal Diagnosis* 2005;25:1040-4.
 26. Gautier E, Benachi A, Giovangrandi Y, Ernault P, Olivi M, Gaillon T, Costa J-M. Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: A two-year experience. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2005;192:666-9.

27. Hromadnikova I, Vechetova L, Vesela K, Benesova B, Doucha J, Vlk R. Non-invasive Fetal RHD and RHCE Genotyping Using Real-time PCR Testing of Maternal Plasma in RhD-negative Pregnancies. *J Histochem Cytochem* 2005;53:301-5.
28. Chan KCA, Ding C, Gerovassili A, Yeung SW, Chiu RWK, Leung TN, Lau TK, Chim SSC, Chung GTY, Nicolaides KH, Lo YMD. Hypermethylated RASSF1A in Maternal Plasma: A Universal Fetal DNA Marker that Improves the Reliability of Noninvasive Prenatal Diagnosis. *Clin Chem* 2006;52:2211-8.
29. Geifman-Holtzman O, Grotegut CA, Gaughan JP. Diagnostic accuracy of noninvasive fetal Rh genotyping from maternal blood--A meta-analysis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2006;195:1163-73.
30. Page-Christiaens GC, Bossers B, Van Der Schoot CE, De Haas M. Use of Bi-Allelic Insertion/Deletion Polymorphisms as a Positive Control for Fetal Genotyping in Maternal Blood. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006;1075:123-9.
31. Van der Schoot CE, Soussan AA, Koelewijn J, Bonsel G, Paget-Christiaens LGC, de Haas M. Non-invasive antenatal RHD typing. *Transfusion Clinique et Biologique* 2006;13:53-7.
32. Zimmermann BG, Holzgreve W, Avent N, Hahn S. Optimized Real-Time Quantitative PCR Measurement of Male Fetal DNA in Maternal Plasma. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006;1075:347-9.
33. Clausen FB, Krog GR, Rieneck K, Dziegiel MH. Improvement in fetal DNA extraction from maternal plasma. Evaluation of the NucliSens Magnetic Extraction system and the QIAamp DSP Virus Kit in comparison with the QIAamp DNA Blood Mini Kit. *Prenat Diagn* 2007;27:6-10.
34. Finning K, Martin P, Summers J, Daniels G. Fetal genotyping for the K (Kell) and Rh C, c, and E blood groups on cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Transfusion* 2007;47:2126-33.
35. Finning K, Martin P, Summers J, Massey E, Poole G, Daniels G. Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *BMJ* 2008;336:816-8.
36. Kimura M, Sato C, Hara M, Ishihara O, Ikebuchi K. Noninvasive fetal RHD genotyping by maternal plasma with capillary electrophoresis. *Transfusion* 2008;48:1156-63.
37. Li Y, Finning K, Daniels G, Hahn S, Zhong X, Holzgreve W. Noninvasive genotyping fetal Kell blood group (KEL1) using cell-free fetal DNA in maternal plasma by MALDI-TOF mass spectrometry. *Prenatal Diagnosis* 2008;28:203-8.

38. Minon JM, Gerard C, Senterre JM, Schaaps JP, Foidart JM. Routine fetal RHD genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium. *Transfusion* 2008;48:373-81.
39. Müller SP, Bartels I, Stein W, Emons G, Gutensohn K, Köhler M, Legler TJ. The determination of the fetal D status from maternal plasma for decision making on Rh prophylaxis is feasible. *Transfusion* 2008;48:2292-301.
40. Orzińska A, Guz K, Brojer E, Żupańska B. Preliminary results of fetal Rhc examination in plasma of pregnant women with anti-c. *Prenatal Diagnosis* 2008;28:335-7.
41. Daniels G, Finning K, Martin P, Massey E. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal blood group phenotypes: current practice and future prospects. *Prenatal Diagnosis* 2009;29:101-7.
42. Hyland CA, Gardener GJ, Davies H, Ahvenainen M, Flower RL, Irwin D, Morris JM, Ward CM, Hyett JA. Evaluation of non-invasive prenatal RHD genotyping of the fetus. *Med J Aust* 2009;191:21-5.
43. Amaral DR, Credidio DC, Pellegrino J, Jr., Castilho L. Fetal RHD genotyping by analysis of maternal plasma in a mixed population. *J Clin Lab Anal* 2011;25:100-4.
44. Müller SP, Bartels I, Stein W, Emons G, Gutensohn K, Legler TJ. Cell-free fetal DNA in specimen from pregnant women is stable up to 5 days. *Prenat Diagn* 2011;31:1300-4.
45. Scheffer PG, van der Schoot CE, Page-Christiaens GC, de Haas M. Noninvasive fetal blood group genotyping of rhesus D, c, E and of K in alloimmunised pregnant women: evaluation of a 7-year clinical experience. *BJOG* 2011;118:1340-8.
46. Tounta G, Vrettou C, Kolialexi A, Papantoniou N, Destouni A, Tsangaris GT, Antsaklis A, Kanavakis E, Mavrou A. A multiplex PCR for non-invasive fetal RHD genotyping using cell-free fetal DNA. *In Vivo* 2011;25:411-7.
47. Tynan JA, Angkachatchai V, Ehrich M, Paladino T, van den Boom D, Oeth P. Multiplexed analysis of circulating cell-free fetal nucleic acids for noninvasive prenatal diagnostic RHD testing. *Am J Obstet Gynecol* 2011;204:251 e1-6.
48. Doescher A, Petershofen EK, Wagner FF, Schunter M, Müller TH. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms as internal controls in prenatal diagnosis of fetal blood groups. *Transfusion* 2013;53:353-62.
49. Ordonez E, Rueda L, Canadas MP, Fuster C, Cirigliano V. Evaluation of sample stability and automated DNA extraction for fetal sex determination using cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Biomed Res Int* 2013;2013:195363.
50. Bundesamt: Destatis 2015; <http://www-genesis.destatis.de>.

51. Cheong YC, Goodrick J, Kyle PM, Soothill P. Management of anti-Rhesus-D antibodies in pregnancy: a review from 1994 to 1998. *Fetal Diagn Ther* 2001;16:294-8.
52. Howard H, Martlew V, McFadyen I, Clarke C, Duguid J, Bromilow I, Eggington J. Consequences for fetus and neonate of maternal red cell allo-immunisation. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1998;78:F62-6.

ANHANG

6. PUBLIKATION

Originalarbeit:

Adamczyk, T., Doescher, A., Haydock, P.V., Aldrich, R., Petershofen, K., Müller, T.H.

The glass slide extraction system Snap Card improves non-invasive prenatal genotyping in pregnancies with antibodies.

Transfusion Medicine and Hemotherapy 2015; 42: 379-384

The Glass Slide Extraction System Snap Card Improves Non-Invasive Prenatal Genotyping in Pregnancies with Antibodies

Thomasz Adamczyk^a Andrea Doescher^b Paul V. Haydock^c Russ Aldrich^c
Eduard K. Petershofen^b Thomas H. Müller^d

^a Medical Hospital 'Links der Weser', Gesundheit Nord, Department Internal Medicine, Bremen, Germany;

^b German Red Cross Blood Transfusion Service NSTOB, Institute Oldenburg, Germany;

^c Blood Cell Storage, Inc., Seattle, WA, USA;

^d German Red Cross Blood Transfusion Service NSTOB, Institute Springe, Germany

Keywords

Cell-free DNA · Non-invasive prenatal genotyping · DNA extraction

Summary

Background: Determination of fetal blood groups in maternal plasma samples critically depends on adequate pre-analytical steps for optimal amplification of fetal DNA. We compared the extraction of cell-free DNA by binding on a glass surface (BCSI SNAP™ Card) with an automated system based on bead technology (MagnaPure compact™). **Methods:** Maternal blood samples from 281 pregnancies (7th–39th week of gestation) with known antibodies were evaluated in this study. Both the SNAP card and the MagnaPure method were applied to isolate DNA in order to directly compare the amplification in a single base extension assay and/or real-time PCR. **Results:** The mean concentration of total DNA obtained by the SNAP card (33.8 ng/μl) exceeded more than twofold that of MagnaPure extraction (15.7 ng/μl). SNAP card-extracted samples allowed to detect 3.7 single nucleotide polymorphisms (SNPs) versus 2.5 SNPs in MagnaPure extracts to control for traces of fetal DNA. This difference is highest for samples from 7th–13th week of gestation. **Conclusion:** The SNAP card system improves DNA extraction efficacy for prenatal diagnosis in maternal blood samples and provides an at least

eightfold higher total amount of DNA for the ensuing analysis. Its advantage is most evident for samples from early stages of pregnancy and thus especially valuable for pregnancies with antibodies.

© 2015 S. Karger GmbH, Freiburg

Introduction

Fetal red blood cell (RBC) antigens are relevant in the pathologic involvement of maternal alloantibodies causing hemolytic disease of the fetus (HDF) or newborn (HDN). For diagnostic procedures, traces of fetal DNA circulating in the plasma of pregnant women are nowadays used for determination of blood groups of the fetus [1]. This non-invasive approach introduces a valuable alternative to invasive procedures, e.g. amniocentesis or collection of fetal blood, provided that the validity of the non-invasive diagnosis is proven. The reliability of non-invasive *RHD* typing with real-time PCR was investigated in large studies during the past decade [2–13]. The majority of the studies focused on screening of *RHD*-negative pregnant women to assess the need for anti-D-prophylaxis during pregnancy and collected samples after the 20th week of gestation [14–20]. A valid result in fetal genotyping may, however, be clinically meaningful for the diagnostic monitoring of pregnancies as early as 7th–13th week of gestation, especially if antibodies are already detectable in the maternal serum. A negative result in fetal blood group genotyping from maternal blood samples remains inconclusive unless the presence of adequate amounts of

Thomasz Adamczyk and Andrea Doescher have equally contributed to this manuscript.

KARGER

Fax +49 761 4 52 07 14
Information@Karger.com
www.karger.com

© 2015 S. Karger GmbH, Freiburg
1660-3796/15/0426-0379\$39.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/tmh

Dr. Andrea Doescher
DRK-Blutspendedienst NSTOB
Institut Bremen-Oldenburg
Brandenburger Straße 21, 26133 Oldenburg, Germany
doescher@bsd-nstob.de

Table 1. Investigated blood group systems and known antibodies / antibody titer of tested samples

Blood group	Samples	First antibody			Second antibody	
		specificity	samples	titer, range	specificity	titer, range
<i>7th–13th week (n = 28)</i>						
RHD	18	anti-D	16	1–32,768	anti-C anti-K	1–256 1024
KEL 1	8	anti-K	6	1–2,048		
RHc	1	anti-c	1	64		
RHE	1	anti-E	1	16		
<i>14th–24th week (n = 208)</i>						
RHD	136	anti-D	60	1–65,536	anti-C anti-E anti-Jk(a)	1–512 1–32 1–8
KEL 1	27	anti-K	21	1–8,192	anti-Jk(a)	1–64
RHE	18	anti-E	16	1–2,048	anti-c anti-Jk(a)	1–8 1–128
RHc	12	anti-c	12	1–512	anti-S anti-K anti-E anti-S	1–128 1–1,024 1–64 1–8
FY*A	6	anti-Fy(a)	2	1–512		
RHC	3	anti-C	3	1–32	anti-S	1
JK*A	2	anti-Jk(a)	2	1–8		
MNS 1	2	anti-M	1	2		
MNS 3	2	anti-S	2	1–64		
<i>≥25th week (n = 45)</i>						
RHD	22	anti-D	16	1–4,096	anti-C anti-E	1–64 1–8
RHE	10	anti-E	8	1–1,024	anti-c	1–64
KEL 1	3	anti-K	2	1–256		
RHc	5	anti-c	4	1–128	anti-K anti-S anti-Fy(a)	1–512 1–1,024 1
MNS 1	3	anti-M	3	1–8		
MNS 3	1	anti-S	1	1–32		
FY*A	1	anti-Fy(a)	1	1–512		

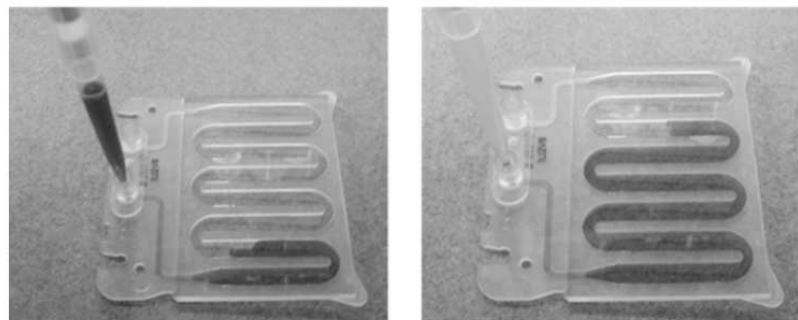


Fig. 1. SNAP card system for binding of cfDNA to the glass surface.

fetal DNA is demonstrated for each individual sample. A valid control for cell-free fetal DNA (cffDNA), neither depending on the gender of the fetus nor requiring a paternal control sample, is essential to fully exploit the potential of methods. Deletion/insertion polymorphisms and single nucleotide polymorphisms (SNPs) are used to discriminate between fetal and maternal DNA on a qualita-

tive basis [21, 22]. Insufficient amplification of cffDNA could occur due to problems with the effectiveness of DNA extraction, especially if the cffDNA concentration in the maternal plasma is very low.

Thus, quality of a specific DNA extraction technology affects the analytical performance of the diagnostic method. Different

Table 2. Comparison of plasma-DNA extraction with MagnaPure and SNAP card technique

	All samples (n = 281)	Week of gestation		
		7th–13th (n = 28)	14th–24th (n = 208)	≥ 25th (n = 45)
<i>MagnaPure compact</i>				
DNA concentration, ng/μl (range)	15.7 (4.9–87.5)	13.6 (5.8–25.6)	15.8 (4.9–87.5)	17.0 (10.1–23.9)
Mean number of informative SNPs	2.6	1.7	2.8	2.1
Mean peak height (SBE)	1,253	998	1,269	1,308
qPCR (RHD only)				
Ct value	36.8 (n = 176)	37.3 (n = 18)	37.0 (n = 136)	35.5 (n = 22)
<i>SNAP card</i>				
DNA concentration, ng/μl (range)	33.8 (17.1–159.1)	32.9 (19.6–93.0)	33.5 (17.1–159.1)	36.3 (18.1–134.4)
Mean number of informative SNPs	3.7	3.3	3.9	2.9
Mean peak height (SBE)	1,596	1,750	1,633	1,455
qPCR (RHD only)				
Ct value	37.4 (n = 176)	38.2 (n = 18)	37.5 (n = 136)	36.6 (n = 22)
Mean fetal DNA yield (% of MagnaPure extraction)	116.2 (1.4–357.6)	143.5 (28.0–336.6)	117.7 (1.4–357.6)	87.6 (20.6–248.5)

technologies for extraction of maternal plasma, e.g. binding on spin columns or magnetic particles, have been evaluated for non-invasive prenatal blood group genotyping [23, 24].

DNA extraction from cell-free plasma by binding to the surface of a glass slide introduces an innovative approach for this purpose [25]. The SNAP card consists of an S-shaped plastic channel sandwiched by two glass slides. The sample can be flowed through the channel allowing contact between the sample and the flat glass surfaces to which the nucleic acids will bind (fig. 1).

We, therefore, compared this new method with our routine procedure based on magnetic particles to investigate plasma samples from 281 pregnant women with known antibodies or suspect of antibodies due to pregnancies in the past.

Material and Methods

Samples and DNA Preparation

EDTA-anticoagulated blood samples from 281 pregnant women (9th–36th week of gestation) were sent to our laboratory for routine non-invasive typing of fetal blood groups (table 1). Plasma was prepared according to Lo et al. [1]. DNA was extracted in parallel from 500 μl of plasma using the MagnaPure large volume DNA isolation kit (MagnaPure compact™, Roche Diagnostics, Grenzach-Whylen, Germany) and the BCSI SNAP card. (Blood Cell Storage Inc. Seattle, WA, USA). The binding time for cell-free DNA (cfDNA) on the glass surface of the SNAP card varied from 18–24 h followed by 2 × 3 automated wash steps with buffer I and II and 10 min air-drying of the card. The final elution volume was 200 μl (SNAP card) and 50 μl (MagnaPure), respectively.

Genomic DNA from maternal samples was isolated with the PureGeneD Kit according to the manufacturers' instructions (PureGene Blood Core Kit B; QIAGEN, Hilden, Germany).

Quantification of the Total DNA Concentration

Total DNA yield and purity of the extracted DNA was examined by UV-spectroscopy (NanoDrop 1000; NanoDrop Technologies, Kisker, Steinfurt, Germany).

SNP Detection

DNA from 281 plasma samples (fetal DNA and maternal DNA for comparison) was screened for *RHD* exons 3, 4, 5 and 7 in a multiplex PCR setting in-

cluding 52 SNPs divided into 4 primer pools as described previously [21]. SBE products were identified due to dye and size with the GeneScan method in an ABI 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and analyzed with GenMapper™ software (version 4.0; Applied Biosystems) using the maximum-signal method for peak normalization.

Real-Time PCR

cfDNA from MagnaPure and SNAP card extraction was tested in duplicates for the presence of *RHD* exon 10 as reported in detail elsewhere [21]. For calculation of cfDNA, standard curves were included in each qPCR run. Determination of % fetal DNA yield was done similar to Clausen et al. [23]

Results

The comparison of both methods for DNA extraction was based on maternal samples from 281 pregnancies: 28 from a pregnancy at week 7–13 of gestation, 208 from week 14–24 of gestation, and 45 from week ≥ 25 of gestation. The concentration of total DNA in the eluates extracted in parallel from identical samples by both methods was measured. The quantitative PCR to detect *RHD* exon 10 was performed only in those samples (n = 176) known from their initial investigation to be *RHD*-positive. All maternal blood samples (n = 281) were typed for 52 SNPs with single base extension. The results are summarized in table 2.

DNA Extraction

The extraction of cfDNA by binding to a glass surface has been compared to our standard automated magnetic beads technique. The mean concentration of total DNA for all samples extracted with the SNAP card was 33.8 ng/μl (range 17.1–159.1 ng/μl) compared to 15.7 ng/μl (range 4.9–87.5 ng/μl) using magnetic particles. The substantially higher DNA extraction yield of SNAP card-extracted samples was confirmed for all samples, independent of the week of gestation. The extraction purity, characterized as ratio 260/280 nm, was 1.8 or higher for SNAP card preparation and varied between 1.3 and 1.5 for MagnaPure assay (data not shown).

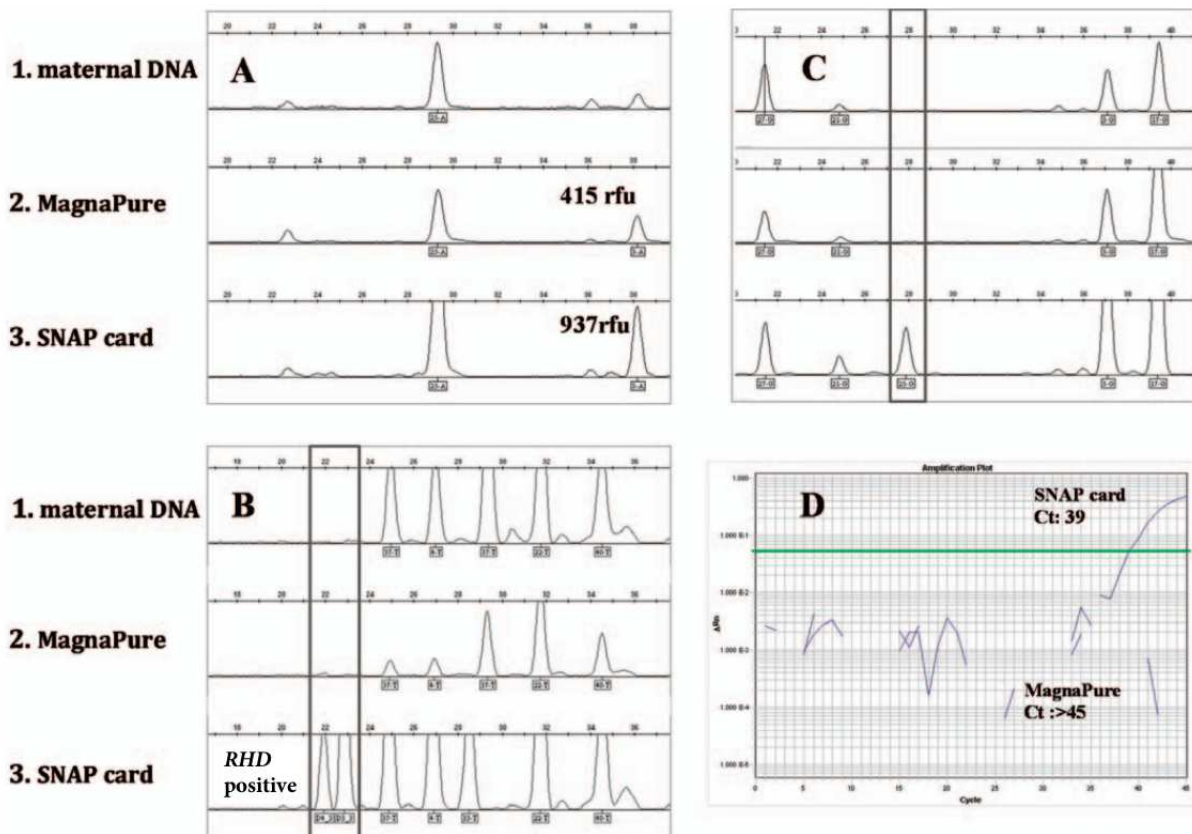


Fig. 2. Single base extension assay for determination of paternal SNPs and real-time PCR for the detection of *RHD*-specific sequences (12th week of gestation). **A** Higher peaks of SNAP card DNA (937 rfu) compared to MagnaPure extraction (415 rfu). **B** *RHD*-positive results for SNAP card sample, MagnaPure and maternal sample were D-negative. **C** Positive internal control in SNAP card sample; no signal in MagnaPure extracted DNA. **D** Real-time PCR with positive results for SNAP card DNA.

Single Base Extension

Single base extension assays serving as gender-independent internal controls showed higher (fig. 2A) and/or more peaks for paternal SNPs in the SNAP card-extracted samples (fig. 2B,C). The number of informative SNPs calculated for all samples was 3.7 in cfDNA from SNAP card compared to 2.6 after MagnaPure extraction. Samples from week 7–13 s of gestation had a mean of 3.3 informative SNPs in extracts prepared by SNAP card versus 1.7 for extracts obtained by magnetic bead technology. The mean difference in peak height examined for all samples and 52 SNPs was 343 relative fluorescence units (rfu). The mean peak height difference for all samples collected in the 1st trimester was 752 rfu, decreasing to 364 for samples in the 2nd and 147 in the 3rd trimester.

Real-Time PCR

A difference of 0.5–1.1 was observed for threshold cycles (Ct values) in real-time amplification of *RHD* exon 10 comparing samples extracted with either method when a positive result was obtained. The mean yield of cfDNA (%) for all samples was 116.2 ($p < 0.0001$) with the highest value found in samples from the 1st

trimester (table 2). 14 MagnaPure-extracted samples (7th–13th week of gestation: $n = 3$; 14th–24th week of gestation: $n = 11$) failed in detection of *RHD* exon 10 while their SNAP card counterparts showed positive results.

Discussion

Non-invasive prenatal genotyping is an elegant approach to determine the fetal blood group genotype in pregnancies with known antibodies and at risk of HDN. The pre-analytical steps are essential for the success of the downstream applications, e.g. real-time PCR or fragment length analysis. In addition to the transport of the samples from the gynecologist to the laboratory [26] and the preparation of the plasma, the extraction of cfDNA affects at least the sensitivity of the genotyping method [23, 24]. In addition, different extraction methods show different yields in cfDNA and cffDNA from plasma [23].

The SNAP card system bases on the capturing of DNA on untreated flat glass slides in the presence of chaotropic salts. The sys-

tem is automated with washing and elution steps, and only cell lyses and proteinase treatment of the sample have to be done manually, with a hand-on time of approximately 10 min. Special experiences of the operator are not necessary.

We designed a study to systematically evaluate this extraction technology for non-invasive prenatal genotyping. Maternal plasma samples stored at -80°C up to 96 months were introduced into this study and were compared to our standard DNA extraction system for prenatal genotyping [20]. These systems have been optimized to detect the presence of both the *RHD* gene and sufficient amounts of cfDNA.

The results demonstrate the advantages of the extraction of cfDNA from plasma using glass slides. The SNAP card system provides both a higher concentration as well as a higher absolute yield of total nucleic acids. In respect to the different elution volume of the methods, the absolute yield of DNA was fourfold higher with the SNAP card procedure. A mean amount of $6.76\ \mu\text{g}$ total DNA was isolated by the SNAP card system in comparison to $0.79\ \mu\text{g}$ total DNA extracted by the MagnaPure procedure. The quality of the total nucleic acids, indicated by a $260/280\ \text{nm}$ ratio of ≥ 1.8 , was better in SNAP card technique. Interestingly, the higher ratio did not affect the results of the real-time PCR. In contrast, the Ct values of MagnaPure-extracted samples were lower than the SNAP card counterparts (0.5–1.1). Since both samples were tested in the identical real-time PCR run, the Ct values may be the result of a lower qPCR efficiency because of different composition of elution buffers of both extraction methods. Nevertheless, the mean yield of cfDNA (%) was significantly higher in samples extracted with the SNAP card, especially in samples of the 1st trimester.

Both the number and the height of single base extension peaks were higher in DNA samples prepared with the SNAP card

method. Calculated for all samples, the number of single base extension peaks, serving as internal controls for cfDNA, was 3.7 (SNAP card) and 2.6 (MagnaPure). Interestingly, samples from the 7th–13th week of gestation provided 3.3 informative SNPs when using glass-bound DNA compared to 1.7 for magnetic bead-bound DNA. In addition, the internal controls in this subgroup showed higher values for SNAP card DNA (MagnaPure 998 rfu; SNAP card 1,750 rfu).

An example is given in figure 2 for a pregnancy at 12th week of gestation and an initial anti-D antibody of 2,048 rfu. In contrast to the MagnaPure extraction, the SNAP card DNA provided valid *RHD* typing results based on successful real-time PCR and single base extension assays. Such a failure of the typing with our standard extraction method in contrast to the SNAP card system was observed in 3/18 samples from the 1st trimester.

In our study, 94% of the samples collected from gestational week 7–13 were from women with at least one antibody. Our results emphasize the benefit of the glass slide extraction method in early pregnancies.

Acknowledgement

We acknowledge the expert technical assistance of Claudia Vogt and Simone Gnoth.

Disclosure Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest relevant to this manuscript.

References

- Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CWG, Wainscoat JS: Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485–487.
- Bischoff FZ, Nguyen DD, Marquez-Do D, Moise KJ Jr, Simpson JL, Elias S: Noninvasive determination of fetal RhD status using fetal DNA in maternal serum and PCR. *J Soc Gynecol Invest* 1999;6:64–69.
- Brojer E, Zupanska B, Guz K, Orzinska A, Kalinska A: Noninvasive determination of fetal RHD status by examination of cell-free DNA in maternal plasma. *Transfusion* 2005;45:1473–1480.
- Faas BH, Beuling EA, Christiaens GC, von dem Borne AE, van der Schoot CE: Detection of fetal RHD-specific sequences in maternal plasma. *Lancet* 1998;352:1196.
- Gautier E, Benachi A, Giovannardi Y, Ernault P, Oliivi M, Gaillon T, Costa J-M: Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: a two-year experience. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192:666–669.
- Geifman-Holtzman O, Grotegut CA, Gaughan JP: Diagnostic accuracy of noninvasive fetal Rh genotyping from maternal blood – a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:1163–1173.
- Hromadnikova I, Vechetova L, Vesela K, Benesova B, Doucha J, Vlk R: Non-invasive fetal RHD and RHCE genotyping using real-time PCR testing of maternal plasma in RhD-negative pregnancies. *J Histochem Cytochem* 2005;53:301–305.
- Minon JM, Gerard C, Senterre JM, Schaaps JP, Foidart JM: Routine fetal RHD genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium. *Transfusion* 2008;48:373–381.
- Nelson M, Eagle C, Langshaw M, Popp H, Kronenberg H: Genotyping fetal DNA by non-invasive means: extraction from maternal plasma. *Vox Sang* 2001;80:112–116.
- Randen I, Hauge R, Kjeldsen-Kragh J, Fagerhol MK: Prenatal genotyping of RHD and SRY using maternal blood. *Vox Sang* 2003;85:300–306.
- Rouillac-Le Scielour C, PP, 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.
- Van der Schoot CE, Soussan AA, Koelewijn J, Bonsel G, Paget-Christiaens LGC, de Haas M: Non-invasive antenatal RHD typing. *Transfus Clin Biol* 2006;13:53–57.
- Zhang J, Fidler C, Murphy MF, Chamberlain PF, Sargent IL, Redman CW, Hjelm NM, Wainscoat JS, Lo YM: Determination of fetal RhD status by maternal plasma DNA analysis. *Ann N Y Acad Sci* 2000;906:153–155.
- Clausen FB, Krog GR, Rieneck K, Nielsen LK, Lundquist R, Finning K, Dickmeiss E, Hedegaard M, Dziogiel MH: Reliable test for prenatal prediction of fetal RhD type using maternal plasma from RhD negative women. *Prenat Diagn* 2005;25:1040–1044.
- Finning K, Martin P, Summers J, Massey E, Poole G, Daniels G: Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *BMJ* 2008;336:816–818.
- Finning KM, Martin PG, Soothill PW, Avent ND: Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion* 2002;42:1079–1085.
- Lucy Raymond F, Whittaker J, Jenkins L, Lench N, Chitty LS: Molecular prenatal diagnosis: the impact of modern technologies. *Prenat Diagn* 2010;30:674–681.
- Muller SP, Bartels I, Stein W, Emons G, Gutensohn K, Kohler M, Legler TJ: The determination of the fetal D status from maternal plasma for decision making on Rh prophylaxis is feasible. *Transfusion* 2008;48:2292–2301.

- 19 Rijnders RJ, Christiaens GC, Bossers B, van der Smagt JJ, van der Schoot CE, de Haas M: Clinical applications of cell-free fetal DNA from maternal plasma. *Obstet Gynecol* 2004;103:157-164.
- 20 Turner MJ, Martin CM, O'Leary JJ: Detection of fetal Rhesus D gene in whole blood of women booking for routine antenatal care. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;108:29-32.
- 21 Doescher A, Petershofen EK, Wagner FF, Schunter M, Muller TH: Evaluation of single-nucleotide polymorphisms as internal controls in prenatal diagnosis of fetal blood groups. *Transfusion* 2013;53:353-362.
- 22 Page-Christiaens GC, Bossers B, Van Der Schoot CE, De Haas M: Use of bi-allelic insertion/deletion polymorphisms as a positive control for fetal genotyping in maternal blood. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1075:123-129.
- 23 Clausen FB, Krog GR, Rieneck K, Dziegiel MH: Improvement in fetal DNA extraction from maternal plasma. Evaluation of the NucliSens Magnetic Extraction system and the QIAamp DSP Virus Kit in comparison with the QIAamp DNA Blood Mini Kit. *Prenat Diagn* 2007;27:6-10.
- 24 Ordonez E, Rueda L, Canadas MP, Fuster C, Cirigliano V: Evaluation of sample stability and automated DNA extraction for fetal sex determination using cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Biomed Res Int* 2013;2013:195363.
- 25 Nanassy OZ, Haydock PV, Reed MW: Capture of genomic DNA on glass microscope slides. *Anal Biochem* 2007;365:240-245.
- 26 Muller SP, Bartels I, Stein W, Emons G, Gutensohn K, Legler TJ: Cell-free fetal DNA in specimen from pregnant women is stable up to 5 days. *Prenat Diagn* 2011;31:1300-1304.

7. ERKLÄRUNG

Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nrn. 6 und 7 der Promotionsordnung der Medizinischen Hochschule Hannover

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Evaluierung eines neuartigen Verfahrens zur Extraktion zellfreier DNA für die nichtinvasive Bestimmung fetaler Blutgruppenmerkmale aus maternalem Blut“

im Institut für Transfusionsmedizin in Oldenburg des DRK-Blutspendedienst NSTOB

unter Betreuung von Prof. Dr. Thomas Müller und
mit der Unterstützung durch Dr. Andrea Döscher

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsverfahren ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Ergebnisse der Dissertation wurden in folgendem Publikationsorgan

Transfusion Medicine and Hemotherapy **2015**; 42: 379-384

veröffentlicht.

Hannover, den 15. März 2018

8. LEBENS LAUF

Tomasz Adamczyk

Geburtsdatum: 07.01.1978

Adresse: Kissinger Str.7
28215 Bremen

Telefon: (0421) 5662487

Mobil: (0163) 7562153

E-Mail: thamides@gmx.de



Berufliche Tätigkeiten und Qualifikationen:

Seit 01.2016	Oberarzt Medizinische Klinik I im Klinikum Bremen Mitte
2014 - 2015	Stationsarzt Palliativstation, Klinikum Links der Weser; Bremen Zusatzbezeichnung Palliativmedizin
2012 - 2014	Stationsarzt Klinik für Hämato-Onkologie, Klinikum Oldenburg Zusatzbezeichnung Hämatologie und intern. Onkologie
2008 – 2011	Assistenzarzt in der Abteilung für Hämato-Onkologie, DIAKO/Bremen Facharzt für Innere Medizin
2007	Assistenzarzt in der Medizinischen Klinik des Marienhospital Vechta
2006	Assistenzarzt in der Abt. für Innere Medizin, Mathilden Hospital Herford
2005	Assistenzarzt in Geriatrischer Fachklinik, Meiningen Approbation als Arzt in Deutschland
2003 - 2004	Arzt im Praktikum in Woiwodschaftskrankenhaus in Tychy

Wissenschaftliche Tätigkeiten:

2013 – 2014 Experimentelle Untersuchungen zur nichtinvasiven
Pränataldiagnostik im Institut Oldenburg, DRK-Blutspendedienst
NSTOB

Ausbildung:

1997 - 2003 Studium der Humanmedizin an der Hochschule in Katowice, Polen

1996 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife am II. Lyzeum in Tychy

Bremen, den 15.3.2018