

Stanovení *RHD* genotypu plodu z plazmy periferní krve těhotné ženy a posouzení citlivosti nových diagnostických postupů pro zavedení do klinické praxe

RHD genotyping from cell-free fetal DNA circulating in pregnant women peripheral blood and sensitivity assessment of innovated diagnostic approaches for introduction into the clinical practice

Böhmová J.¹, Vodička R.¹, Lubušský M.^{1,2}, Studničková M.³, Holusková I.³, Vrtěl R.¹, Kratochvílová R.¹, Frydrychová M.¹, Krejčířiková E.¹, Filipová H.¹

¹Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny FN a LF UP, Olomouc, přednosta prof. MUDr. J. Šantavý, Ph.D.

²Porodnicko-gynekologická klinika FN a LF UP, Olomouc, přednosta prof. MUDr. R. Pilka, Ph.D.

³Transfuzní oddělení FN a LF UP, Olomouc, vedoucí MUDr. D. Galuszková, Ph.D., MBA

ABSTRACT

Objective: Introduction of fetal *RHD* genotyping from cell-free fetal DNA circulating in the peripheral blood of pregnant women to clinical practice. Sensitivity assessment of innovated method using range of dilution series and internal control of amplification.

Design: Procedure creating of noninvasive determination of fetal *RHD* genotyping from blood plasma of pregnant women. Detection of limit of minority representation *RHD*+/- sample in the *RHD*-/- sample.

Setting: University Hospital Olomouc, Institute of Medical Genetics and Fetal Medicine, Clinic of Obstetrics and Gynecology, Transfusion Department.

Methods: 1. TaqMan Real-Time PCR without an internal amplification controls.

2. Optimization and calibration of *RHD* genotyping using *RHD* multiplex by TaqMan Real-Time PCR with an internal amplification control and by minisequencing (Snapshot – multiplex) with an internal amplification controls.

Results: 1. *RHD* positive or negative fetuses were determined by amplification curves from Real-Time PCR system that matches the parameters for the evaluation of the output data using series of amplification and contamination parallel controls.

2. TaqMan based Real-Time PCR and minisequencing (SNaPshot) based quantification were able to detect 0.22% of artificial *RHD*+/- sample diluted in *RHD*-/- sample. In addition, SNaPshot assay is suitable for heterozygosity and homozygosity recognition.

Conclusion: Current established and routinely used procedure is based on the detection of exon 7 of the *RHD* gene and on the series of parallel amplification and contamination controls. Both newly developed methods could be, after validation of the larger set of control samples, introduced into clinical practice.

KEYWORDS

***RHD* genotyping – cell-free fetal DNA – maternal plasma – TaqMan Real-Time PCR – SNaPshot – minisequencing**

SOUHRN

Cíl studie: Vytvoření a zavedení metodického postupu pro neinvazivní stanovení *RHD* genotypu plodu z volné fetální DNA cirkulující v periferní krvi těhotné ženy do klinické praxe. Posouzení citlivosti inovované metodiky pomocí ředící řady a vnitřní kontroly amplifikace. Zjištění detekčního limitu minoritního zastoupení *RHD*+/- genotypu ve vzorku *RHD*-/-.

Typ studie: Prospektivní kohortová a metodologická studie.

Název a sídlo pracoviště: Fakultní nemocnice Olomouc: Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny, Porodnicko-gynekologická klinika, transfuzní oddělení.

Metodika: 1. TaqMan real-time PCR bez vnitřní kontroly amplifikace.

2. Stanovení prahu citlivosti a kalibrace *RHD* multiplexu TaqMan real-time PCR multiplexem s vnitřní kontrolou amplifikace a kapilární elektroforézou – minisekvencí (SNaPshot – multiplex) s vnitřní kontrolou amplifikace.

Výsledky: 1. *RHD* pozitivní nebo *RHD* negativní plod byl určen na základě amplifikačních křivek z real-time PCR systému, které odpovídají stanoveným parametrům pro hodnocení výstupních dat s využitím série kontrol amplifikace a kontaminace.

2. Metody TaqMan real-time PCR systém a minisekvence byly schopny detekovat 0,22% zastoupení *RHD*+/- ve vzorku *RHD*-/-. Minisekvenační systém je vhodný k rozlišení *RHD* pozitivních homozygotů a heterozygotů.

Závěr: V současné době námi zavedený postup založený na detekci exonu 7 genu *RHD* a sérii paralelních kontrol kontaminace a amplifikace je využíván v klinické praxi. Obě nově vypracované metody by měly být spolehlivější a po validaci na rozsáhlejším souboru mohou být zavedeny do klinické praxe.

KLÍČOVÁ SLOVA

***RHD* genotypizace – volná fetální DNA – maternální plazma – TaqMan real-time PCR – SNaPshot – minisekvence**

Čes. Gynek., 2013, 78, č. 1, s. 32–40

ÚVOD

Rh systém je nejvíce polymorfní a imunogenní skupinový systém. Antigeny Rh systému jsou kódovány dvěma geny *RHD* a *RHCE*. Oba geny jsou lokalizovány na dlouhém raménku chromozomu 1. Jsou složeny z 10 kódujících exonů a vykazují 97% identitu. Identita genů je dána jejich evolučním vznikem tandemovou duplikací. Identifikace přítomnosti *RHD* genu u plodu je založena na detekci unikátních sekvencí genu *RHD*, především exonu 7 [3]. *RHD* negativní genotyp u bělošské populace, a tedy i nepřítomnost antigenu D v membráně erytrocytů je dána delecí *RHD* genu v homozygotním stavu.

Pro neinvazivní prenatální *RHD* genotypizaci plodu se využívá nebuněčná fragmentovaná fetální DNA přítomná v plazmě těhotných žen. Procentuální zastoupení volné fetální DNA v plazmě gravidních žen je velmi variabilní a pohybuje se nejčastěji v rozmezí 5–10 % v závislosti na délce gravidity, velikosti placenty, hmotnosti ženy i plodu, patologickém těhotenství apod. [7]. Snahou laboratoře je diagnostikovat *RHD* genotyp plodu již v raném stadiu těhotenství, proto je nutné použít citlivou metodu detekce, jakou je např. real-time polymerázová řetězová reakce (PCR) [6].

Do současnosti však nebyla v České republice provedena studie, která by posoudila citlivost metodiky se zavedením a využitím vnitřní kontroly amplifikace pro účely neinvazivního stanovení *RHD* genotypu plodu pomocí kalibrační řady arteficiálních genotypických směsí.

Cílem práce je vytvoření a zavedení metodického postupu pro neinvazivní stanovení *RHD* genotypu

plodu z volné fetální DNA cirkulující v periferní krvi těhotné ženy do klinické praxe. Posouzení citlivosti inovované metodiky pomocí ředící řady a vnitřní kontroly amplifikace. Zjištění detekčního limitu minoritního zastoupení *RHD*+/- genotypu ve vzorku *RHD*-/-.

SOUBOR A METODIKA

Soubor vzorků

Periferní krev od *RHD* negativních těhotných žen byla odebrána ve spolupráci s klinickými pracovníky Ústavu lékařské genetiky a fetální medicíny, Porodnicko-gynekologické kliniky a transfuzního oddělení Fakultní nemocnice Olomouc (FNOL). Všechny ženy, které byly zařazeny do studie, podepisovaly informovaný souhlas, schválený etickou komisí FNOL.

Počty analyzovaných vzorků jsou uvedeny níže u jednotlivých postupů.

Zpracování a izolace DNA po odběru vzorků

Od každé *RHD* negativní těhotné ženy byla odebrána krev do dvou 9ml zkumavek s EDTA (kyselina etylendiamintetraoctová). Nesrážlivá krev byla ihned po odběru umístěna na led a max. do 4 hodin po odběru zpracována. Plazma byla oddělena od buněčné frakce krve dvojí centrifugací. První centrifugace byla provedena při 2700 g 10 minutách, poté byla provedena separace plazmy a následná recentrifugace dvacet minut při 3500 g v centrifuze IEC Multi RF, Thermo IEC. Vzorky

byly do dalšího zpracování zamrazeny na -28 °C. Plazmatická DNA byla izolována vždy ve dvou paralelních zkumavkách („A“ a „B“). Izolace DNA z 1 ml plazmy byla provedena kitem QiaAmp DNA Mini Kit (Qiagen). Izolace maternální DNA a kontrolního souboru mužů z leukocytů periferní krve byla provedena automatickým izolátorem Qiacube (Qiagen) s využitím kitu QiaAmp DNA mini kit (Qiagen) podle instrukcí v manuálu.

TaqMan real-time PCR bez vnitřní kontroly amplifikace

Celkem bylo testováno 38 vzorků od RHD negativních těhotných žen v různých stádiích těhotenství v rozmezí 13. – 27. týdne gravidity. Plazmatická DNA („A“ i „B“) a DNA z leukocytů periferní krve byly analyzovány ve dvou paralelních reakcích. Sekvence použitých primerů pro RHD exon 7 byly forward GGGTGTGTAACCGAGTGCTG, reverse CCGGCTCCGACGGTATC. Sekvence a značení TaqMan sondy pro RHD exon 7 byla FAM-CCCACAGCTCCATCATGGGCTACAA-BHQ1.

PCR směs pro DNA izolovanou z plazmy RHD negativních těhotných žen o objemu 25 µl obsahovala 12,5 µl Mastermixu (DyNAmo Probe qPCR Kit, Finnzymes), 0,05 µl 50× ROX (DyNAmo Probe qPCR Kit, Finnzymes), 1,5 µl forward primeru (10pmol) (Sigma), 1,5 µl reverse primeru (10pmol) (Sigma), 1 µl TaqMan sondy (10pmol) (Sigma), 8,5 µl DNA.

PCR směs pro DNA izolovanou z leukocytů RHD negativních těhotných žen o objemu 25 µl obsahovala 12,5 µl Mastermixu (DyNAmo Probe qPCR Kit, Finnzymes), 0,05 µl 50× ROX (DyNAmo Probe qPCR Kit, Finnzymes), 7,5 µl PCR vody (Top-Bio), 1,5 µl forward primeru (10pmol) (Sigma), 1,5 µl reverse primeru (10pmol) (Sigma), 1 µl TaqMan sondy (10pmol) (Sigma), 1 µl DNA (100 ng/µl).

Jako kontroly amplifikace a kontaminace byly použity vzorky DNA izolované z RHD pozitivní krve, RHD pozitivní fetální DNA izolované z plazmy a PCR voda pro kontrolu kontaminace PCR reakčních mixů. PCR podmínky byly 95 °C 15 min, (95 °C 15 s, 60 °C 60 s) 55×. Amplifikace byla provedena real-time PCR systémem Mx3005P (Stratagene). Pro vyhodnocení byl využit software MxPro - Mx3005P v3.00 Build 311 (Stratagene). Pro každou skupinu vzorků byly stanoveny prahové hodnoty tzv. Ct hodnoty (počet cyklů, při kterém fluorescence přesáhne prahovou hodnotu). Před odečtením byla naměřená fluorescence logaritmována.

Stanovení citlivosti u RHD multiplexů pomocí kalibračních křivek TaqMan real-time PCR systémem a kapilární elektroforézou

Do testování bylo zařazeno 15 kontrolních vzorků od RHD pozitivních mužů a 35 kontrolních vzorků

od RHD negativních mužů. Pro stanovení prahu citlivosti byly vytvořeny arteficiální směsi genotypů vzájemným ředěním vzorků DNA prokazaného RHD pozitivního heterozygota a RHD negativního homozygota o koncentraci 5 ng/µl (naměřené s využitím kitu Quantifiler Human DNA Quantification Kit, Applied Biosystems) v rozmezí 0,22 % - 100 %. Pro amplifikaci a kvantifikaci multiplexu s vnitřní kontrolou amplifikace TaqMan real-time PCR systémem byly použity primery z exonu 7, jejich sekvence jsou forward GGGTGTGTAACCGAGTGCTG a reverse CCGGCTCCGACGGTATC. Sekvence a značení TaqMan sondy pro RHD exon 7 bylo FAM-CCCACAGCTCCATCATGGGCTACAA-BHQ1.

Sekvence použitých primerů pro RHD exon 10 byly forward CCTCTCACTGTTGCCTGCATT, reverse AGTGCCTGCGCGAACATT. Sekvence a značení TaqMan sondy pro RHD exon 10 bylo VIC-TACGTGAGAAACGCTCATGACAGCAAAGTCT-BHQ1.

Pro vnitřní kontrolu amplifikace byly použity primery a sondy z lokusu AMELX/Y s následujícími sekvencemi forward CTGCTTCTCTGGTTGGAGTCA, reverse GGTGCTGCAGCCATCCA, TaqMan sonda AMELX Cy3-AACCATAGGAAGGTAAGTCTG-BHQ2, TaqMan sonda AMELY Cy5-AACCATAGGAAGAGTACTG-BHQ3.

PCR multiplex o objemu 12,5 µl obsahoval 6,25 µl Mastermixu (DyNAmo Probe qPCR Kit, Finnzymes), 0,05 µl 50× ROX (DyNAmo Probe qPCR Kit, Finnzymes), 1,5 µl forward a reverse multiplexu primerů (koncentrace primerů pro RHD exon 7 a RHD exon 10 byla 10pmol, koncentrace primerů pro AMELX/Y byla 20pmol) (Sigma), 1 µl multiplexu TaqMan sond (koncentrace sond pro RHD exon 7, RHD exon 10 a AMELY byla 5pmol, koncentrace sondy pro AMELX byla 15pmol) (Sigma), 3,75 µl PCR vody (Top-Bio), 0,5 µl DNA arteficiální směsi genotypů (0,22% - 100%) nebo 0,5 µl DNA kontrolních vzorků (100 ng/µl) nebo 0,5 µl PCR vody (kontrola kontaminace PCR reakčních mixů). PCR probíhala za následujících podmínek 95 °C 15 min, (95 °C 15 s, 60 °C 60 s) 55×. Amplifikace byla provedena real-time PCR systémem Mx3005P (Stratagene). Pro vyhodnocení byl využit software MxPro - Mx3005P v3.00 Build 311 (Stratagene).

Kvantifikace kapilární elektroforézou byla provedena pomocí minisekvence (SNaPshot) multiplexu s vnitřní kontrolou amplifikace.

Použity byly následující sekvence primerů pro RHD exonu 7 a vnitřní kontrolu amplifikace forward CACAGCTCCATCARGGGCTA, reverse CCGGCTCCGACGGTATC, AMELX/Y forward CACTGCTGCTTCTCTGGTTGGAGTCA, reverse CACGGGATGATTTGGTGGTGCAGC.

PCR multiplex o objemu 12,5 µl obsahoval 6,25 µl Combi PPP Master Mixu (Top-Bio), 5,25 µl PCR vody (Top-Bio), 0,5 µl forward a reverse multiple-

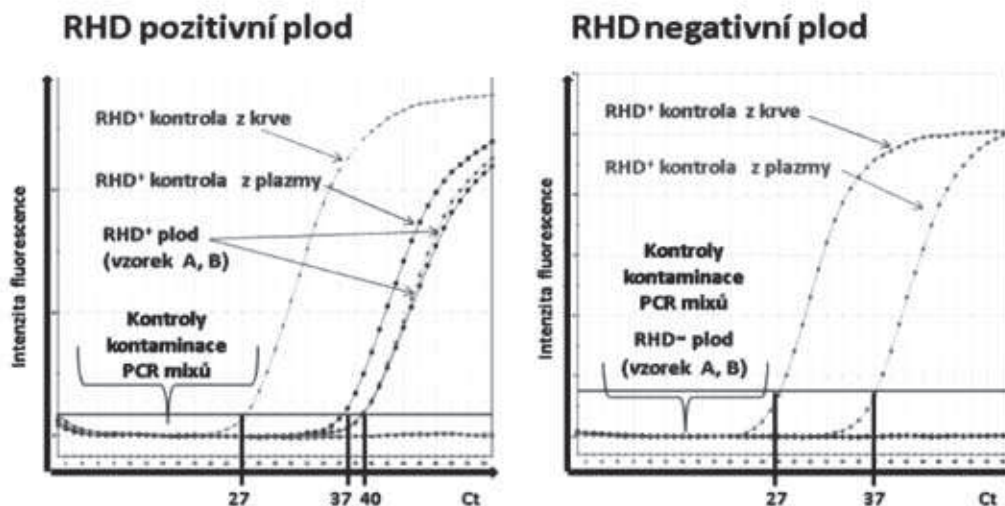
xu primerů (koncentrace primerů pro RHD exon 7 a AMELX/Y byla 10pmol) (Sigma), 0,5 μl DNA arteficiální směsi genotypů (0,22 % - 100 %) nebo 0,5 μl DNA kontrolních vzorků (100 ng/μl). PCR probíhala za následujících podmínek 95 °C 10 min, (95 °C 30 s, 63 °C 60 s, 72 °C 60 s) 35×, 72 °C 10 min. Amplifikace byla provedena v termocykleru C1000 (BIO-RAD). Enzymatické přečištění PCR produktů bylo provedeno pomocí exonukleázy I (Exonuclease – Thermo Scientific, Fermentas) a alkalické fosfatázy (Termo Scientific FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase – Thermo Scientific, Fermentas) podle manuálu. Byly použity tyto SNaPshot primery: 14T-AGCACCAGCAGACAATGTAG (pro RHD exon 7), GGGCTCGTAACCATAGGAAG (pro vnitřní kontrolu amplifikace AMELX/Y). Amplifikace byla provedena kitem ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit (Applied Biosystems) v termocykleru C1000 (BIO-RAD). Přečištění sekvenačních PCR produktů bylo provedeno enzymaticky alkalickou fosfatázou Thermo Scientific FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Termo Scientific, Fermentas) podle protokolu ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit (Applied Biosystems). Vlastní detekce a snímání dat proběhla na kapilární elektroforéze ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems) za standardních podmínek. Analýza byla provedena pomocí programu Gene Mapper (Applied Biosystems). Kvantifikace byla měřena podílem relativní fluorescence (RFU) pomocí výšky píku AMELX a RHD7.

VÝSLEDKY

Interpretace pozitivních a negativních signálů v klinické praxi TaqMan real-time PCR bez vnitřní kontroly amplifikace

DNA izolovaná z RHD pozitivní krve je detekována v rozmezí 25–30 PCR cyklů. Empiricky jsme nastavili přijatelné rozmezí výsledků vyšetření pro stanovení RHD genotypu plodu z volné fetální DNA na 35–45 cyklů v obou paralelních PCR (pro vzorek „A“ i „B“). Pokud je Ct detekováno pod 30. PCR cyklem, potom signál odpovídá 100% příspěvku RHD pozitivních buněk. Pokud je Ct detekováno nad 50. PCR cyklem nebo není detekováno vůbec, potom se jedná o RHD negativní plod (neodpovídá asi 5% příspěvku volné fetální DNA).

V systému paralelních kontrol musí mít DNA matky z leukocytů periferní krve negativní signál, případně velmi slabý pozitivní signál (nad 50 PCR cyklů). Dále rozmezí PCR cyklů pro kontrolní RHD pozitivní fetální DNA z maternální plazmy je 35–45 cyklů a kontrolní DNA izolovaná z RHD pozitivní krve má pozitivní signál (25–30 cyklů). PCR voda jako kontrola kontaminace PCR reakčních mixů připravených pro DNA izolovanou z maternální plazmy a pro DNA izolovanou z krve musí mít negativní signál. Následující varovné kritické hodnoty vedou k opakování vyšetření: testované vzorky „A“ i „B“ jsou detekovány mezi 30–35 PCR cykly nebo mezi 45–50 PCR cykly. Pozitivní signál



Obr. 1 Ukázka rozlišení RHD pozitivního a RHD negativního plodu pomocí real-time polymerázové řetězové reakce (PCR). Amplifikační křivky znázorňují fluorescenční intenzitu exonu 7 genu RHD v závislosti na počtu PCR cyklů (Ct). RHD+ kontrola z krve: RHD+ DNA izolovaná z leukocytů periferní krve. RHD+ kontrola z plazmy: RHD+ DNA izolovaná z krevní plazmy těhotné RHD- ženy. RHD+ plod: RHD+ vzorky („A“ a „B“) DNA izolované z krevní plazmy těhotné RHD- ženy. RHD- plod: RHD- vzorek DNA izolované z krevní plazmy těhotné RHD negativní ženy. Kontroly kontaminace PCR RHD: PCR mix pro DNA izolovanou z leukocytů s PCR vodou a PCR mix pro DNA izolovanou z plazmy s PCR vodou.

je detekován pouze v jednom vzorku („A“ nebo „B“). Kontroly amplifikace mají negativní signál. Kontroly kontaminace mají pozitivní signál. Vzorek DNA z leukocytů matky má pozitivní signál v obou PCR.

Na základě výše uvedených hodnotících kritérií bylo stanoveno 34 RHD pozitivních a 4 RHD negativních plodů (obr. 1).

Stanovení citlivosti u RHD multiplexů pomocí kalibračních křivek

TaqMan real-time PCR multiplexový systém (AMELX, AMELY, RHD 7, RHD 10) byl schopen detekovat 0,22% arteficiální RHD+/- směsi, přičemž 0,22% směsi odpovídal Ct signál z 48. PCR cyklu pro exon 7 (graf 1) a z 46. PCR cyklu pro exon 10 (graf 2). Směsím, které by mohly modelovat zastoupení fetálních molekul v plazmě (asi 5% - 10%), odpovídaly Ct signály od 39. - 41. PCR cyklu pro exon 7 (graf 1) a z 40. - 41. PCR cyklu pro exon 10 (graf 2). Kontrolní pozitivní vzorky byly detekovány v rozmezí PCR cyklů 33 - 35 (graf 1, 2).

Kvantifikaci založenou na minisekvenaci (SNaPshot) bylo možné detekovat 0,22% arteficiální RHD+/- směsi (graf 3, obr. 2), přičemž podíl RFU hodnot AMELX/RHD7 byl 32,7.

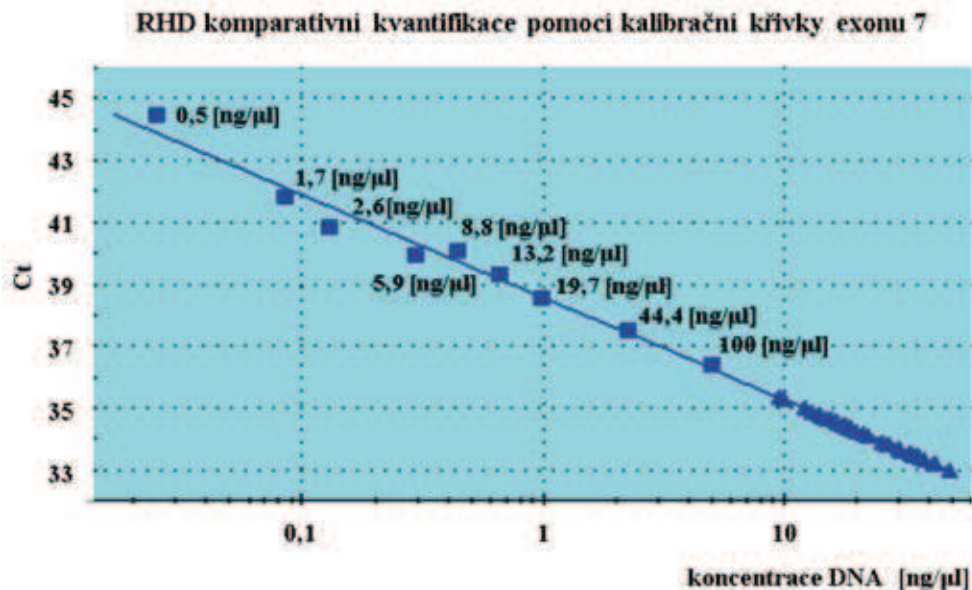
Směsím, které by mohly modelovat zastoupení fetálních molekul v plazmě (5% - 10%), odpovídaly

podíly RFU hodnot 4,3 - 3,3. Pozitivní vzorky byly detekovány v rozmezí podílů RFU hodnot 2 - 1,8. Na základě podílů RFU hodnot RHD pozitivních vzorků bylo možno rozlišit RHD homozygoty a RHD heterozygoty (graf 4, obr. 3).

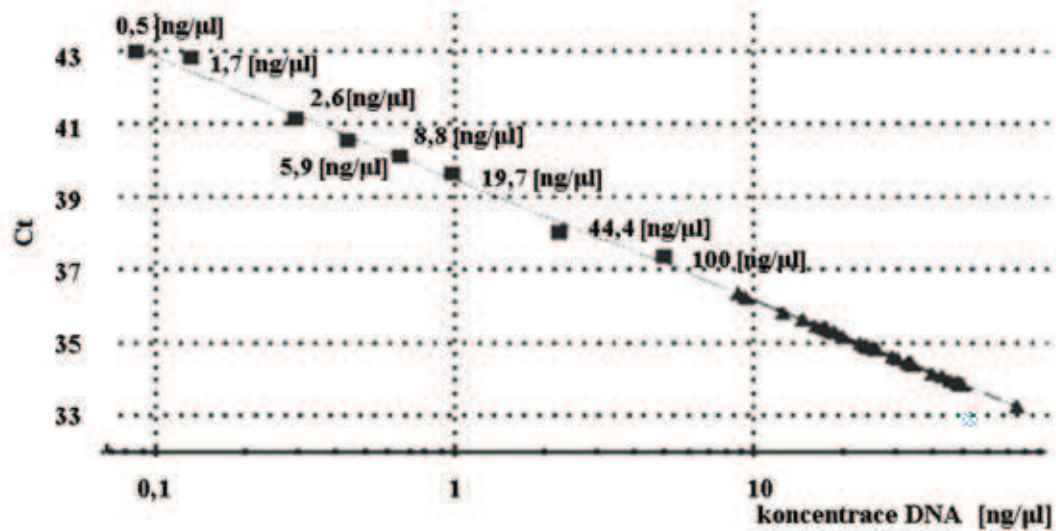
DISKUSE

Stanovení RHD genotypu plodu (RHD+/RHD-) z krevní plazmy těhotných žen se v současnosti nejčastěji provádí metodou real-time PCR. Vzhledem k sekvenční unikátnosti je nejčastějším lokusem pro o určení RHD genotypu plodu exon 7 [5, 8, 9, 12]. Některé studie byly provedeny pouze na malém souboru vzorků [4, 12], nicméně výsledky na rozsáhlejších souborech prokázaly vysokou specifitu a senzitivitu. Müller a kol. testovali 1113 RHD negativních těhotných žen. Senzitivita stanovení RHD genotypu plodu byla 99,7%, specifita 99,2% [6].

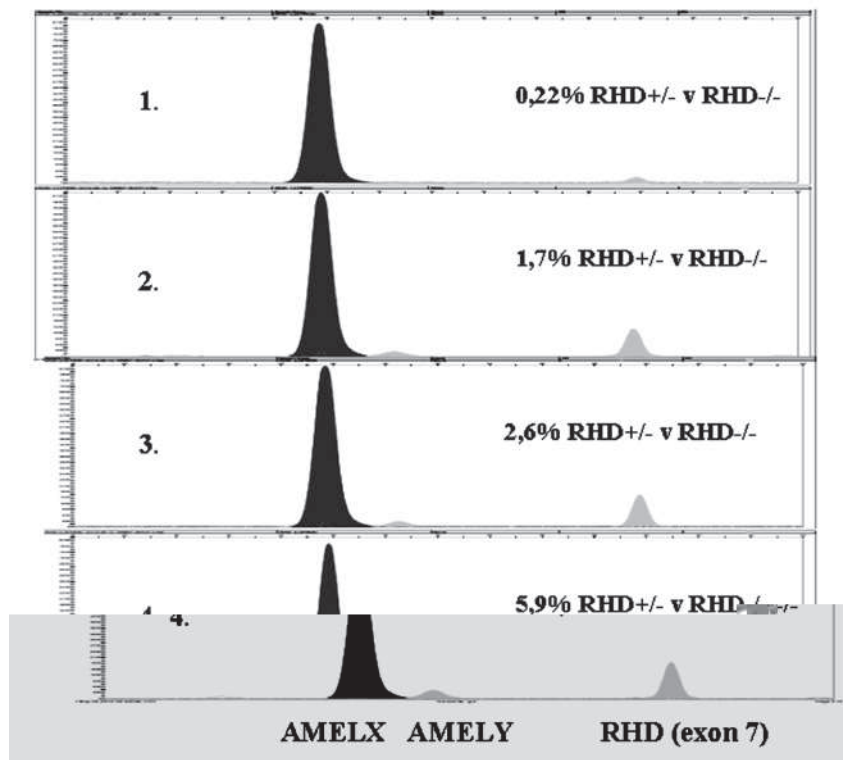
Při izolaci a manipulaci s volnou fetální DNA hrozí riziko její kontaminace RHD pozitivní exogenní DNA. Tato kontaminace by vzhledem k malému množství volné fetální DNA mohla být interpretována jako falešně pozitivní výsledek při stanovení RHD genotypu plodu. Avšak falešná pozitivita nepředstavuje zvýšené riziko rozvoje erytrocytární aloimunizace u RHD negativní těhotné ženy ani



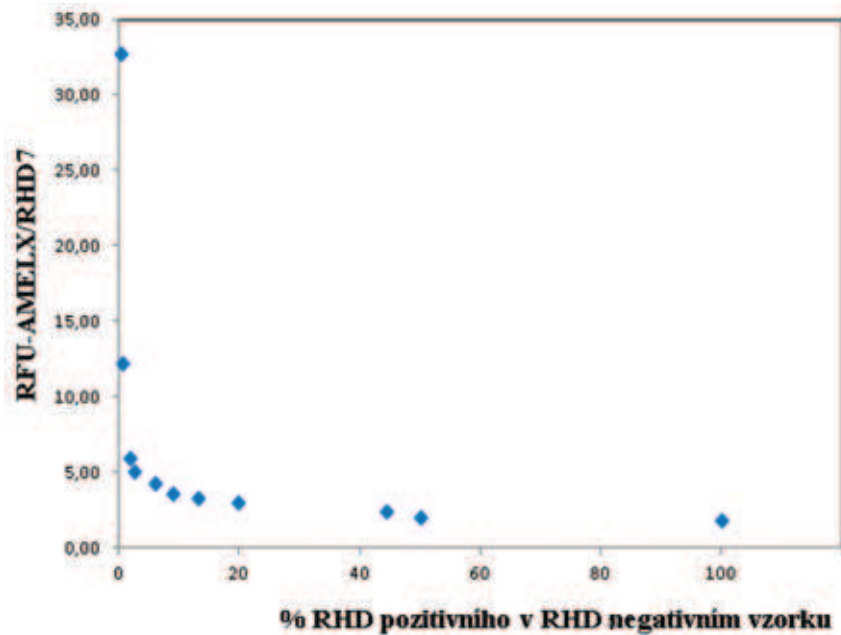
Graf 1 Komparativní kvantifikace exonu 7 pomocí real-time polymerázové řetězové reakce. Komparativní kvantifikace kontrolních RHD pozitivních mužských DNA vzorků byla provedena pomocí standardní křivky exonu 7 z arteficiálních směsí RHD genotypů. ■ Arteficiální vzorky ředící řady, ▲ RHD pozitivní mužské vzorky.



Graf. 2 Komparativní kvantifikace exonu 10 pomocí real-time polymerázové řetězové reakce (PCR). Komparativní kvantifikace kontrolních *RHD* pozitivních mužských DNA vzorků byla provedena pomocí standardní křivky exonu 10 z arteficiálních směsí *RHD* genotypů. ■ Arteficiální vzorky ředící řady, ▲ *RHD* pozitivní mužské vzorky.



Obr. 2 Ukázka citlivosti detekce SNaPshot systémem. Stanovení citlivosti detekce s využitím minisekvence (SNaPshot) *RHD* pozitivních vzorků arteficiálních genotypových směsí (*RHD*+/- mužské DNA a *RHD*-/- ženské DNA) kapilární elektroforézou. V první až čtvrté řadě jsou ukázky 0,22%, 1,7%, 2,6% a 5,9% arteficiálních genotypových směsí.



Graf 3 Stanovení citlivosti detekce SNaPshot systémem. Stanovení citlivosti detekce s využitím minisekvenace (SNaPshot) pomocí *RHD* pozitivních vzorků arteficiálních genotypových směsí (*RHD*+/- mužské DNA a *RHD*-/- ženské DNA) kapilární elektroforézou. Osa y: kvantifikace byla provedena na základě podílu parametru RFU (relativní fluorescenční jednotka) *AMELX/RHD7*. RFU je vyjádřena výškou píku, od kterého je odečtena prahová fluorescence. Osa x: procentuální zastoupení *RHD*+/- genotypu v *RHD*-/- genotypu.

nepředstavuje zvýšené riziko rozvoje hemolytické nemoci plodu a novorozence u již aloimunizované těhotné ženy. Zvýšené riziko chybného klinického managementu pro těhotnou ženu, plod i novorozence představuje jen falešná negativita. Z tohoto důvodu je nutné používat sérii kontrol amplifikace a kontaminace (obr. 1) a přesně nastavit hraniční a kritické parametry pro hodnocení výstupních dat. Použití vnitřní kontroly amplifikace (β -globin, SRY u plodů mužského pohlaví) pomáhá snížit riziko falešně negativního výsledku [6, 9].

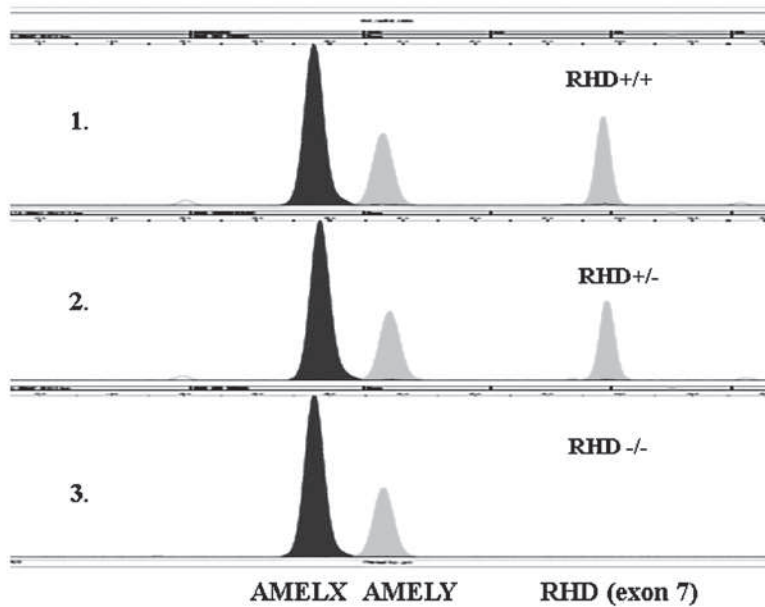
Námi zvolený postup využívaný v klinické praxi je v současnosti založený na detekci signálu z exonu 7 a dále na řadě paralelních kontrol, které by měly zabezpečit, že vzorek není kontaminován a zároveň je DNA amplifikovatelná. Empiricky nastavené hodnoty jsou ve shodě s našimi výstupy z měření pomocí standardních kalibračních křivek.

Práce zabývající se neinvazivním stanovením *RHD* genotypu plodu se zaměřují na uniplexové [1, 4] nebo multiplexové systémy [2, 6, 9]. Použití multiplexového systému (např. exon 5, exon 7 a exon 10) je vhodné i zvýšení validity výsledku *RHD* genotypizace plodu. Dalším využívaným systémem pro de-

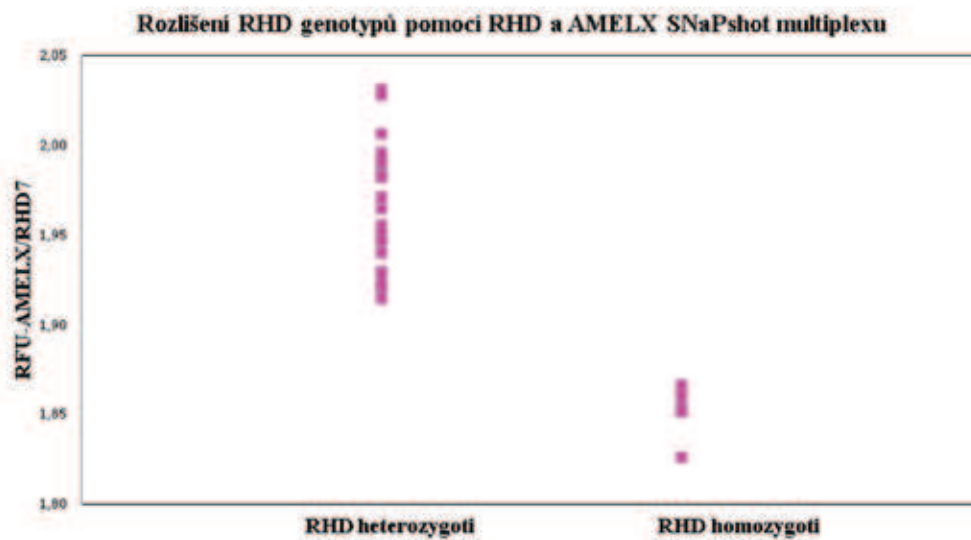
tekci *RHD* genotypů je minisekvenace (SNaPshot). Metoda je založena na prodloužení primerů rozdílných délek o jednu bázi (fluorescenčně značeného dideoxynukleotidu). Kapilární elektroforézou je poté určena délka prodlouženého primeru a typ fluorescenční značky. Tato metoda je vhodná pro multiplexové reakce [10, 11].

Pro stanovení prahu citlivosti detekce TaqMan real-time PCR systémem a minisekvenací (SNaPshot) byla provedena *RHD* kalibrace pomocí ředící řady vhodných *RHD* genotypů. Oběma metodami bylo možné zachytit 0,22% příměs *RHD* pozitivního heterozygota v *RHD* negativním homozygotovi (graf 1–3, obr. 2). V rámci optimalizací byla testována možnost detekovat *RHD* genotyp TaqMan real-time multiplexovým systémem pomocí různých značených sond pro *RHD7/RHD10/AMELX/AMELY*. Dále byla metodika rozšířena o analýzu *RHD* genotypu pomocí minisekvenace kapilární elektroforézou v rámci jedné multiplexové *RHD7/AMELX/AMELY* reakce. Obě metody správně a shodně stanovily všechny pozitivní a negativní kontrolní vzorky u sledovaného souboru.

Na základě minisekvenace bylo navíc možné rozlišit *RHD* pozitivní homozygoty od heterozygotů (graf 4, obr. 3).



Obr. 3 Ukázka rozlišení RHD genotypů pomocí minisekvence (SNaPshot).
 1. V první řadě je ukázka *RHD* pozitivního homozygota. 2. V druhé řadě je ukázka *RHD* heterozygota. 3. Ve třetí řadě je ukázka *RHD* negativního homozygota.



Graf. 4 Rozlišení *RHD* pozitivního homozygota a heterozygota pomocí minisekvence (SNaPshot).
 Rozlišení *RHD* pozitivního homozygota a heterozygota na základě podílů parametru RFU (relativní fluorescenční jednotka) *AMELX/RHD7*.

ZÁVĚR

V současné době námi zavedený postup založený na detekci exonu 7 genu *RHD* a sérii paralelních kontrol kontaminace a amplifikace je využíván v klinické praxi. Obě nově navržené metody budou dále posuzovány na reprezentativním souboru vzorků a kontrol (500 těhotných *RHD* negativních žen, 200 *RHD* pozitivních a 200 *RHD* negativních kontrolních vzorků) a plánujeme jejich využití v rutinní klinické praxi.

Podpořeno grantem IGA MZ ČR
NT-11004-3/2010, NT-12225-4/2011.

LITERATURA

1. **Gautier, E., Benachi, A., Giovangrandi, Y., et al.** Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: a two-year experience. *Am J Obstet Gynecol*, 2005, 192, 3, p. 666–669.
2. **Chinen, PA., Nardoza, LM., Martinhago, CD., et al.** Noninvasive determination of fetal rh blood group, D antigen status by cell-free DNA analysis in maternal plasma: experience in a Brazilian population. *Am J Perinatol*, 2010, 27, 10, p. 759–762.
3. **Innan, H.** A two-locus gene conversion model with selection and its application to the human *RHCE* and *RHD* genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100, 15, p. 8793–8798.
4. **Lázár, L., Nagy, B., Bán, Z., et al.** Non invasive detection of fetal Rh using real-time PCR method. *Orv Hetil*, 2007, 148, 11, p. 497–500.
5. **Macher, HC., Noguero, P., Medrano-Campillo, P., et al.** Standardization non-invasive fetal *RHD* and *SRY* determination into clinical routine using a new multiplex RT-PCR assay for fetal cell-free DNA in pregnant women plasma: results in clinical benefits and cost saving. *Clin Chim Acta*, 2012, 413, 3–4, p. 480–484.
6. **Müller, SP., Bartels, I., Stein, W., et al.** The determination of the fetal D status from maternal plasma for decision making on Rh prophylaxis is feasible. *Transfusion*, 2008, 48, 11, p. 2292–2301.
7. **Palomaki, GE., Kloza, EM., Lambert-Messerlian, GM., et al.** DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet Med*, 2011, 13, 11, p. 913–920.
8. **Sedrak, M., Hashad, D., Adel, H., et al.** Use of free fetal DNA in prenatal noninvasive detection of fetal RhD status and fetal gender by molecular analysis of maternal plasma. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2011, 15, 9, p. 627–631.
9. **Scheffer, PG., van der Schoot, CE., Page-Christiaens, GC., et al.** 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, 11, p. 1340–1348.
10. **Silvy, M., Simon, S., Gouvitsos, J., et al.** Weak D and DEL alleles detected by routine SNaPshot genotyping: identification of four novel *RHD* alleles. *Transfusion*, 2011, 51, 2, p. 401–411.
11. **Silvy, M., Chapel-Fernandes, S., Callebaut, I., et al.** Characterization of novel *RHD* alleles: relationship between phenotype, genotype, and trimeric architecture. *Transfusion*, 2012, elektronické verze před tiskem doi: 10.1111/j.1537-2995.2011.03544.x.
12. **Wang, XD., Wang, BL., Ye, SL., et al.** Non-invasive foetal *RHD* genotyping via real-time PCR of foetal DNA from Chinese RhD-negative maternal plasma. *Eur J Clin Invest*, 2009, 39, 7, p. 607–617.

Mgr. R. Vodička, Ph.D.

Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny
Fakultní nemocnice Olomouc
I. P. Pavlova 6
775 20 Olomouc
e-mail: vodickar@fnol.cz