

## Optimalizace izolace extracelulární fetální DNA pro neinvazivní *SRY*, *RHD* a *RHCE* genotypizaci plodu z periferní krve těhotných žen

Hromadníková I.<sup>1</sup>, Žejšková L.<sup>1</sup>, Veselá K.<sup>1</sup>, Vydrová M.<sup>1</sup>, Doucha J.<sup>2</sup>, Schrollová R.<sup>3</sup>, Wagenknecht D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoř buněčné biologie, Pediatriká klinika, <sup>2</sup>Gynekeologicko-porodnická klinika, <sup>3</sup>Krevní banka 2. LF UK a Fakultní nemocnice Motol, Praha

### Souhrn

Provedli jsme modifikaci a optimalizaci postupů pro izolaci extracelulární DNA z mateřské cirkulace pro neinvazivní určení pohlaví plodu u těhotenství s rizikem X-vázaných onemocnění u plodu a pro neinvazivní *RHD* a *RHCE* genotypizaci plodu u aloimunizovaných těhotenství s rizikem hemolytického onemocnění plodu. V této studii srovnáváme výsledky amplifikace *SRY*, *RHD* a *RHCE* genu na extracelulární DNA izolované z mateřské periferní krve pomocí QIAamp DSP Virus kitu a QIAamp DNA Blood Mini kitu. Výsledky našich analýz prokázaly, že QIAamp DSP Virus kit zvyšuje výtěžnost extracelulární fetální DNA přítomné v mateřské plazmě, což je klíčové zejména u amplifikace paternálně zděděných alel, které se liší od alel maternálních pouze v jednom nukleotidu. Doporučujeme proto provádět detekci paternální Rhc alely a RhE alely *RHCE* genu na extracelulární DNA izolované z mateřské plazmy pouze pomocí QIAamp DSP Virus kitu. Pro amplifikaci *SRY* a *RHD* genu dostačuje extracelulární DNA extrahovaná z mateřské plazmy prostřednictvím QIAamp DNA Blood Mini kitu. V případě sporných výsledků, tj. při nálezů pozdních amplifikačních cyklů (po 40. cyklu), doporučujeme rovněž provedení PCR analýzy na extracelulární DNA izolované z mateřské plazmy pomocí QIAamp DSP Virus kitu. Spolehlivá detekce plodů negativních na aglutinogeny, vůči nimž je matka aloimunizována, vylučuje riziko fetální erytroblastózy. Spolehlivá detekce plodů ženského pohlaví u těhotenství s rizikem X-vázaných onemocnění může vyloučit potřebu invazivního prenatalního vyšetření.

**Klíčová slova:** extracelulární fetální DNA, kvantitativní PCR v reálném čase, mateřská plazma, *RHD* gen, *RHCE* gen

### Summary

Hromadníková I., Žejšková L., Veselá K., Vydrová M., Doucha J., Schrollová R., Wagenknecht D.: Optimization of extracellular fetal DNA isolation for non-invasive fetal *SRY*, *RHD* and *RHCE* genotyping from maternal peripheral blood

We carried out the modification and optimisation of extracellular fetal DNA isolation from maternal circulation for non-invasive fetal sex determination in pregnancies at risk of X-linked disorders and for non-invasive fetal *RHD* and *RHCE* genotyping in alloimmunized pregnancies at risk of haemolytic disease of newborn. In this study, we compared the results of fetal *SRY*, *RHD* and *RHCE* genotyping by analysis of DNA extracted from maternal plasma samples by using QIAamp DSP Virus kit and QIAamp DNA Blood Mini kit. We showed that QIAamp DSP Virus kit enhanced the recovery of extracellular fetal DNA from maternal plasma that is crucial especially for the detection of those paternally-inherited alleles that differ from maternal alleles only in one nucleotide. Therefore we recommend to perform the detection of fetal Rhc allele and RhE allele of *RHCE* gene by analysis of extracellular DNA extracted from maternal plasma samples by using QIAamp DSP Virus kit only. We showed that the use of extracellular DNA extracted from maternal plasma samples by using QIAamp DNA Blood Mini kit is sufficient for non-invasive fetal *SRY* and *RHD* genotyping. In case of controversial results due to the late amplification (Ct  $\geq$  40) we recommend to perform real-time PCR analysis on extracellular DNA extracted from maternal plasma samples by using QIAamp DSP Virus kit. Reliable non-invasive detection of negative foetuses in alloimmunized pregnancies may exclude the risk of haemolytic disease of newborn. Reliable non-invasive detection of female foetuses in pregnancies at risk of X-linked disorders may exclude the performance of invasive prenatal diagnostic procedures.

**Key words:** extracellular fetal DNA, real-time PCR, maternal plasma, *RHD* gene, *RHCE* gene

*Trans. Hemat. dnes, 12, 2006, No. 1, p. 26–30.*

### Úvod

Během těhotenství cirkulují v mateřské periferní krvi extracelulární fetální nukleové kyseliny (DNA a RNA) jako důsledek obnovy buněk placenty a destrukce fetálních buněk imunitním systémem matky, které přecházejí přes placentu do mateřské cirkulace. Nejvýznamnějším zdrojem extracelulárních fetálních nukleových kyselin pro účely neinvazivní prenatalní diagnostiky jsou apo-

ptotická tělíska trofoblastu přítomná v mateřské cirkulaci, která chrání nukleové kyseliny před účinkem všudypřítomných lytických enzymů (Dnáz a RNáz), (1, 2). Vzhledem k přítomnosti jak mateřské, tak fetální DNA, která se nachází v mateřské periferní krvi v minoritě, je však možné detekovat pouze paternálně zděděné alely.

Neinvazivní prenatalní *RHD* a *RHCE* genotypizace plodu umožňuje identifikaci plodů v riziku fetální erytroblastózy (3, 4). Neinvazivní určení pohlaví plodu umožňuje provedení invazivního prenatalního vyšetření

(biopsie choriových klků, amniocentéza) pouze u těch těhotenství s rizikem X-vázaných onemocnění u plodu, u kterých byl neinvazivně určen plod mužského pohlaví (5, 6).

V této studii srovnáváme výsledky amplifikace *SRY*, *RHD* a *RHCE* genu na extracelulární DNA izolované z mateřské periferní krve pomocí QIAamp DSP Virus kitu a QIAamp DNA Blood Mini kitu.

#### Pacienti a metodika

Celkem bylo testováno 25 těhotných žen v rozmezí 12. až 37. týdne gravidity. Všechny pacientky daly informovaný souhlas s odběrem periferní krve pro toto vyšetření.

#### Příprava plazmy

Plazma byla připravena z 10 ml nesrážlivé periferní krve (EDTA) nejpozději 24 hodin po odběru (centrifugace 1200 g 10 min.). Poté byla plazma stočena znovu a skladována při -80 °C až do dalšího zpracování. Abychom minimalizovali riziko kontaminace vzorků, prováděli jsme veškeré zpracování biologického materiálu v laminárním boxu třídy II a pro pipetování jsme používali aerosol rezistentní špičky.

#### Izolace DNA z mateřské plazmy pomocí QIAamp DSP Virus kitu

DNA byla extrahována z 1 ml mateřské plazmy za použití QIAamp DSP Virus kitu (Qiagen, Hilden, Germany) podle modifikovaného protokolu výrobce. Snížené množství QIAGEN Proteázy (20 µl) bylo použito k rozštěpení proteinů. Odstranění reziduálních solí a proteinů bylo provedeno vakuovým systémem (QIAvac 24 Plus, Qiagen, Hilden, Germany) a bylo rovněž použito snížené množství promývacích pufrů (600 µl AW1, 750 µl AW2, 750 µl ethanol). DNA byla eluována 60 µl AVE pufru a 15,0 µl eluátu bylo použito pro amplifikaci paternálních alel.

#### Izolace DNA z mateřské plazmy pomocí QIAamp DNA Blood Mini kitu

DNA byla extrahována z 1 ml mateřské plazmy za použití QIAamp DNA Blood Mini kitu (Qiagen, Hilden, Germany) podle modifikovaného protokolu výrobce. Snížené množství QIAGEN Proteázy (20 µl) bylo použito k rozštěpení proteinů. Odstranění reziduálních solí a proteinů bylo provedeno centrifugačně (bez použití vakuového systému) a bylo rovněž použito snížené množství promývacích pufrů (500 µl AW1, 500 µl AW2). K úplnému

**Tab. 1.** Srovnání výsledků amplifikace *SRY* genu na extracelulární DNA izolované z mateřské periferní krve pomocí QIAamp DSP Virus kitu a QIAamp DNA Blood Mini kitu.

PČ	IČ	Týden gravidity	QIAamp DNA Blood Mini kit (Ct)	QIAamp DSP Virus kit (Ct)	Karyotyp
1	1127	16	2/2 + 37.3, 39.4	2/2+ 34.2, 35.4	46,XY
2	1325	36	3/3+ 32.8, 32.9, 33.2	3/3+ 29.3, 30.6, 30.8	46,XY
3	1219	32	3/3+ 34.4, 34.6, 35.8	3/3+ 32.8, 33.2, 33.5	46,XY
4	1181	16	ND	0/3 -	46,XX
5	1426	36	ND	0/3 -	46,XX
6	1074	16	ND	0/3 -	46,XX
7	1470	36	ND	0/3 -	46,XX
8	1330	36	ND	0/3 -	46,XX
9	1031	12	ND	0/3 -	46,XX

ND- analýza neprovedena

**Tab. 2.** Srovnání výsledků amplifikace *RHD* genu na extracelulární DNA izolované z mateřské periferní krve pomocí QIAamp DSP Virus kitu a QIAamp DNA Blood Mini kitu.

PČ	IČ	Týden gravidity	QIAamp DNA Blood Mini kit (Ct)		QIAamp DSP Virus kit (Ct)		Rh fenotyp pupečník
			<i>RHD</i> exon 10	<i>RHD</i> exon 7	<i>RHD</i> exon 10	<i>RHD</i> exon 7	
1	1527	12	3/3 + 37.3, 38.7, 40.0	ND	3/3 + 34.5, 34.9, 35.2	ND	Rh D poz.
2	1710	18	3/3 + 37.0, 37.1, 38.1	ND	3/3 + 33.2, 33.3, 34.1	ND	Rh D poz.
3	1730	16	2/3 + 37.2, 37.7	ND	3/3 + 34.1, 34.2, 34.6	ND	Rh D poz.
4	1629	36	0/14-	0/14-	0/3-	0/3-	Rh D neg.
5	779	12	0/21-	0/7-	0/3-	0/3-	Rh D neg.
6	855	15	0/5-	0/5-	0/3-	0/3-	Rh D neg.
7	901	37	0/4-	0/4-	0/3-	0/3-	Rh D neg.

ND - analýza neprovedena

Rh fenotyp byl vyšetřen z pupečníkové krve po narození dítěte.

**Tab. 3.** Srovnání výsledků amplifikace c alely *RHCE* genu (exon 2) na extracelulární DNA izolované z mateřské periferní krve pomocí QIAamp DSP Virus kitu a QIAamp DNA Blood Mini kitu.

PČ	IČ	Týden gravidity	QIAamp DNA Blood Mini kit	QIAamp DSP Virus kit	Rh fenotyp pupečník
1	1658	30	<b>0/6 -</b> 41.1, 43.1, 45.1, 46.7, 46.9, 47.7	<b>3/3 +</b> 36.6, 38.4, 37.7	CcDee
2	1142	36	<b>3/3 +</b> 35.5, 36.9, 37.9	<b>3/3 +</b> 34.2, 34.61, 34.8	CcDee
3	998	33	<b>2/7 +</b> 40.0, 40.0, 41.2	<b>6/6 +</b> 36.2, 37.7, 38.3, 39.2, 39.6, 39.9	CcDee
4	1216	12	<b>0/14 -</b>	<b>0/3 -</b>	CCDee

Rh fenotyp byl vyšetřen z pupečníkové krve po narození dítěte.

**Tab. 4.** Srovnání výsledků amplifikace E alely *RHCE* genu (exon 5) na extracelulární DNA izolované z mateřské periferní krve pomocí QIAamp DSP Virus kitu a QIAamp DNA Blood Mini kitu.

PČ	IČ	Týden gravidity	QIAamp DNA Blood Mini kit	QIAamp DSP Virus kit	Rh fenotyp pupečník
1	1553	18	<b>3/12 +</b> 39.0, 40.0, 40.0, 41.2, 41.4, 42.1, 42.6, 43.8	<b>5/6 +</b> 37.1, 38.6, 38.9, 39.2, 40.0	CcDEe
2	1403	19	<b>0/14 -</b>	<b>6/6 +,</b> 34.5, 36.6, 36.7, 36.8, 37.6, 38.9	ccDEe
3	1420	12	<b>1/3 +</b> 40.0, 41.9, 43.3	<b>3/3 +</b> 37.5, 39.6, 40.0	CcDEe
4	1326	12	<b>3/3 +,</b> 36.2, 37.2, 37.8	<b>3/3 +,</b> 31.7, 32.0, 32.1	CcDEe
5	1658	30	<b>0/6 -</b>	<b>0/3 -</b>	CcDee

Rh fenotyp byl vyšetřen z pupečníkové krve po narození dítěte.

odstranění promývacích roztoků byl zařazen navíc centrifugační krok (20 000 g 1 minuta). DNA byla eluována 60  $\mu$ l AE pufru a 15,0  $\mu$ l eluátu bylo použito pro amplifikaci paternálních alel (nepublikovaná data SAFE NoE workshop).

#### PCR v reálném čase

Analýza byla provedena na ABI PRISM 7700 sekvenčním detekčním systému (Applied Biosystem, Branchburg, New Jersey, USA). PCR reakční směs (celkový objem 50  $\mu$ l) obsahovala TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem, Branchburg, New Jersey, USA), optimalizované primery (300 nM pro *SRY*, *RHCE* a 200 nM pro *RHD* exon 10), TaqMan sondu (200 nM pro *SRY*, *RHCE* a 100 nM pro *RHD* exon 10) a 15  $\mu$ l templátu. Podmínky PCR reakce byly nastaveny podle manuálu výrobce (2min. preinkubace při 50 °C potřebná pro aktivaci AmpErase Uracil N-glykosylázy s následnou 10minutovou preinkubací při 95 °C nutnou pro aktivaci AmpliTaq Gold DNA polymerázy; dále 50 cyklů při 95 °C 15 s (denaturace DNA) a 60 °C 1 min. (anelace a syntéza DNA).

Každý vzorek DNA izolovaný z mateřské plazmy byl analyzován v 8jamkových stripech v několika replikátech (tab. 1-4, počet replikátů je popsán u každého vzorku a vyšetření). Pozitivní výsledek byl hodnocen jako detekce fluorescenčního signálu v jamce před 40. cyklem (Ct < 40).

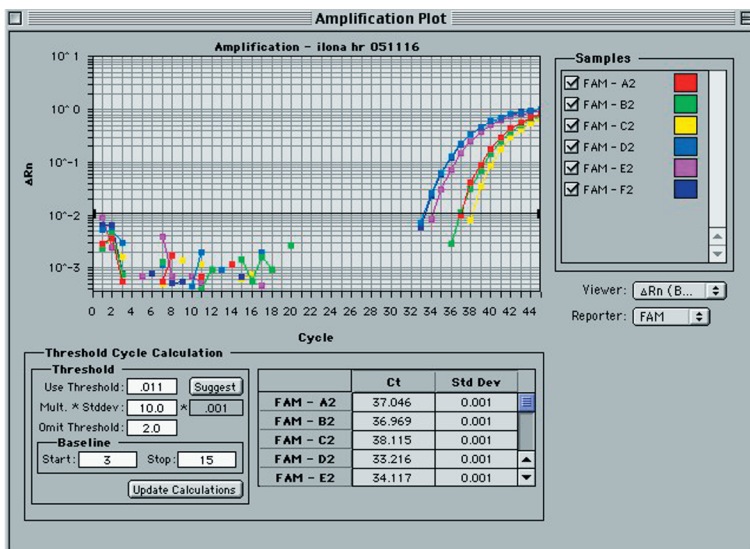
Sekvence jednotlivých primerů a TaqMan sond byly již publikovány v předchozích článcích (3–15).

## Výsledky

Srovnávali jsme výsledky amplifikace paternálních alel na extracelulární DNA izolované z mateřské periferní krve pomocí QIAamp DSP Virus kitu a QIAamp DNA Blood Mini kitu. Výsledky neinvazivní *RHD* a *RHCE* genotypizace plodu provedené na extracelulární DNA extrahované z periferní krve matek jsme korelovali s výsledky imunohematologické analýzy pupečníkové krve po narození dítěte. Výsledky neinvazivní *SRY* genotypizace plodu jsme srovnávali s karyotypem plodu.

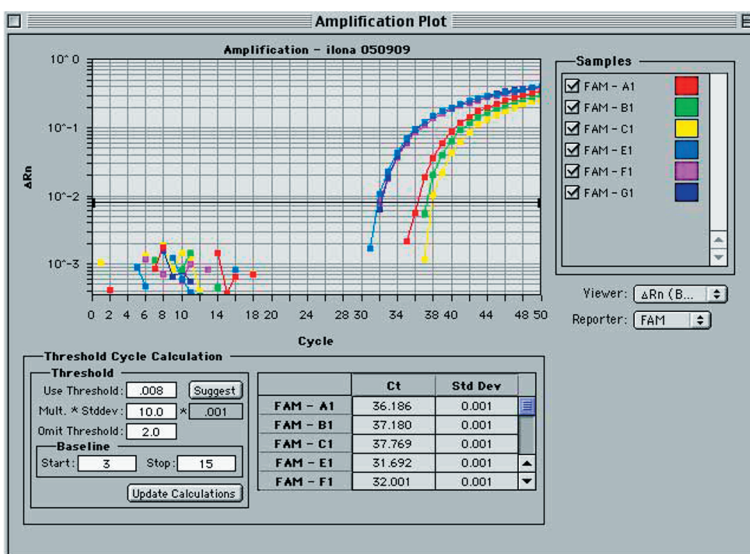
#### Srovnání výsledků *SRY* a *RHD* genotypizace plodu na extracelulární DNA izolované z mateřské periferní krve pomocí QIAamp DSP Virus kitu a QIAamp DNA Blood Mini kitu

Výsledky *SRY* a *RHD* genotypizace plodu provedené na extracelulární DNA extrahované z mateřské plazmy pomocí QIAamp DNA Blood Mini kitu byly ve shodě s karyotypem a Rh fenotypem narozeného dítěte u všech vyšetřených těhotných žen. V případě izolace extracelulární DNA z mateřské periferní krve pomocí QIAamp DSP Virus kitu amplifikovaly paternální alely dříve. Fetální *SRY* gen byl detekován o 1,8–3,6 cykly dříve a fetální *RHD* gen (exon 10) o 3,2–3,9 cykly dříve.



**Obr. 1.** Srovnání výsledků amplifikace *RHD* genu (exon 10) na extracelulární DNA izolované z mateřské periferní krve pomocí QIAamp DSP Virus kitu a QIAamp DNA Blood Mini kitu (pacientka č. 1710, tab. 2).

V případě extracelulární DNA izolované z mateřské periferní krve pomocí QIAamp DSP Virus kitu (FAM-D2, E2, F2) byl fetální *RHD* gen (exon 10) detekován o 3.9 cyklů dříve než v případě extracelulární DNA izolované z mateřské periferní krve pomocí QIAamp DNA Blood Mini kitu (FAM-A2, B2, C2).



**Obr. 2.** Srovnání výsledků amplifikace E alely *RHCE* genu (exon 5) na extracelulární DNA izolované z mateřské periferní krve pomocí QIAamp DSP Virus kitu a QIAamp DNA Blood Mini kitu (pacientka č. 1326, tab. 4)

V případě extracelulární DNA izolované z mateřské periferní krve pomocí QIAamp DSP Virus kitu (FAM-E1, F1, G1) byla fetální E alela *RHCE* genu (exon 5) detekována o 5.1 cyklů dříve než v případě extracelulární DNA izolované z mateřské periferní krve pomocí QIAamp DNA Blood Mini kitu (FAM-A1, B1, C1).

**Srovnání výsledků amplifikace paternálních Rhc a RhE alel RHCE genu na extracelulární DNA izolované z mateřské periferní krve pomocí QIAamp DSP Virus kitu a QIAamp DNA Blood Mini kitu**

Záměrně jsme vybrali plazmy těhotných žen se spornými výsledky *RHCE* genotypizace plodu provedené na extracelulární DNA extrahované z mateřské plazmy pro

střednictvím QIAamp DNA Blood Mini kitu. Amplifikace *c a E* alel *RHCE* genu na DNA extrahované pomocí QIAamp DNA Blood Mini kitu z mateřské plazmy byla v těchto případech negativní (1658, 1403, 1658) a nebo se objevovala až na velmi pozdních cyklech (998, 1553, 1420). Amplifikace provedená na DNA izolované pomocí QIAamp DSP Virus kitu prokázala v těchto sporných případech jasnou přítomnost paternálně zděděných alel, neboť pozitivní výsledek byl detekován ve všech replikátech před 40. cyklem.

**Ověření specifity reakce**

Jelikož QIAamp DSP Virus kit zvyšuje výtěžek nukleových kyselin a zvyšuje amplifikační účinnost PCR reakce, ověřovali jsme rovněž, zda-li nedochází k nespecifické amplifikaci. Celkem jsme analyzovali vzorky 12 těhotných žen. Amplifikace *SRY* genu byla provedena u 6 těhotných žen s plodem ženského pohlaví, amplifikace *RHD* genu (v oblasti exonu 7 a exonu 10) u 4 RhD negativních těhotných žen s RhD negativním plodem, amplifikace E alely *RHCE* genu u jedné těhotné Rhe homozygotní ženy s Rhe homozygotním plodem a amplifikace c alely *RHCE* genu u jedné těhotné RhC homozygotní ženy s RhC homozygotním plodem. Ve všech případech byl výsledek PCR reakce negativní.

**Diskuse**

Provedli jsme modifikaci a optimalizaci postupů pro izolaci extracelulární DNA z mateřské cirkulace prostřednictvím QIAamp DNA Blood Mini kitu a QIAamp DSP Virus kitu pro neinvazivní amplifikaci paternálních alel:

1. neinvazivní určení pohlaví plodu u těhotenství s rizikem X-vázaných onemocnění plodu
2. neinvazivní *RHD* a *RHCE* genotypizaci plodu u aloimunizovaných těhotenství s rizikem hemolytického onemocnění plodu.

QIAamp DNA Blood Mini kit slouží k izolaci celkové DNA z plné krve, krevní plazmy a séra, či jiných tělních tekutin, dále pro izolaci DNA z buněčných kultur či tkání pro PCR a Southern blot aplikace. QIAamp DSP Virus kit byl navržen pro detekci virové DNA a RNA přítomné v krevní plazmě nebo séru prostřednictvím kvantitativní PCR v reálném čase. „Carrier RNA“, která se přidává ke vzorku v případě QIAamp DSP Virus kitu, zvyšuje výtěžek nukleových kyselin, neboť zvyšuje jejich afinitu k siliká-

tové membráně kolonky. Zároveň chrání přítomnou RNA před účinkem RNáz. QIAamp DSP Virus kit využívá k odstranění reziduálních solí a proteinů vakuový systém, čímž se minimalizuje jejich inhibiční efekt na PCR reakci.

Úspěšnost amplifikace paternálních genů na extracelulární DNA izolované z mateřské plazmy závisí na koncentraci přítomné fetální DNA. Výsledky našich analýz prokázaly, že QIAamp DSP Virus kit zvyšuje významně výtěžnost extracelulární DNA přítomné v mateřské plazmě. Koncentrace fetální DNA v mateřské periferní krvi se rovněž zvyšuje s délkou gravidity. V 10. týdnu gravidity je již možno většinou spolehlivě určit pohlaví či RHD genotyp plodu. Dále amplifikaci paternálních genů významně ovlivňuje i kvalita DNA (nepřítomnost inhibitorů PCR reakce). Pro vyloučení inhibice PCR reakce provádíme rovněž amplifikaci kontrolního genu ( $\beta$ -globin) na extrahované směsné extracelulární DNA.

Doporučujeme tedy provádět amplifikaci paternálně zděděných alel, které se liší od alel maternálních pouze v jednom nukleotidu (polymorfismus jednoho nukleotidu) jako např. detekce c alely (*RHCE* gen exon 2) a E alely (*RHCE* gen exon 5) *RHCE* genu na extracelulární DNA izolované z mateřské plazmy pouze pomocí QIAamp DSP Virus kitu.

V případě paternálně zděděných alel, které se liší od maternálních alel přítomností specifických sekvencí, např. přítomnost *RHD* genu u RhD pozitivních plodů, přítomnost *SRY* genu na Y chromozomu u plodů mužského pohlaví, přítomnost specifické inserce v intronu 2 *RHCE* genu u plodů nesoucích C alelu *RHCE* genu, doporučujeme provádět amplifikaci na extracelulární DNA extrahované z mateřské plazmy prostřednictvím QIAamp DNA Blood Mini kitu. V případě sporných výsledků, t.j. při nálezů pozdních amplifikačních cyklů ( $Ct > 40$ ), doporučujeme rovněž provedení PCR analýzy na extracelulární DNA izolované z mateřské plazmy pomocí QIAamp DSP Virus kitu. Tímto způsobem můžeme zajistit spolehlivé neinvazivní určení pohlaví plodu u těhotenství s rizikem X-vázaných onemocnění u plodu a neinvazivní *RHD* a *RHCE* genotypizaci plodu u aloimunizovaných těhotenství s rizikem fetální erytroblastózy.

#### Poděkování

Tato práce vznikla za podpory MSM 0021620806 a MZO 00064203.

Dva vzorky zařazené do této studie byly poskytnuty MUDr. Marcelou Malíkovou z Ústavu biologie a lékařské genetiky FN Motol, dva vzorky Doc. MUDr. Pavlem Caldou, CSc. z Gynekologicko-porodnické kliniky VFN a 1. LF UK, Praha. U těchto vzorků byl Rh fenotyp pupečnicku určen na Transfúzním oddělení, VFN a 1. LF UK, Praha. Jeden vzorek zařazený do této studie byl zaslán MUDr. Milošem Velemínským z Ženského oddělení, Nemocnice České Budějovice.

#### Literatura

1. Lo YM, Chiu RW. The biology and diagnostic applications of placental RNA. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1022: 135–9.
2. Ng EK, Tsui NB, Lau TK, Leung TN, Chiu RW, et al. mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 4748–53.
3. Lo YMD, Hjelm NM, Fidler C, Sargent II, Murphy MF, et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med* 1998; 339: 1734–1738.
4. Legler TJ, Lynen R, Maas JH, Pindur G, Kulenkampff D, et al. Prediction of fetal RhD and Rh CcEe phenotype from maternal plasma with real-time polymerase chain reaction. *Transfus Apheresis Sci* 2002; 27: 217–223.
5. Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Sargent JL. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350: 485–487.
6. Lo YMD, Tein MSC, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum. Implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 768–775.
7. Hromadnikova I, Vesela K, Benesova B, Nekovarova K, Duskovala D, et al. Non-invasive fetal RHD and RHCE genotyping from maternal plasma in alloimmunized pregnancies. *Prenat Diagn* 2005 Oct 17; (Epub ahead of print).
8. Hromadnikova I, Vechetova L, Vesela K, Benesova B, Doucha J, et al. Non-invasive fetal RHD exon 7 and exon 10 genotyping using real-time PCR testing of fetal DNA in maternal plasma. *Fetal Diagn Ther* 2005; 20: 275–280.
9. 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 Rh D negative pregnancies. *J Histochem Cytochem* 2005; 53: 301–305.
10. Hromadnikova I, Houbova B, Hridelova D, Voslarova S, Kofler J, et al. Replicate real-time PCR testing of DNA in maternal plasma increases the sensitivity of non-invasive fetal sex determination. *Prenat Diagn* 2003; 23: 235–238.
11. Hromadnikova I, Houbova B, Hridelova D, Voslarova S, Calda P, et al. Quantitative analysis of DNA levels in maternal plasma in normal and Down syndrome pregnancies. *BMC Pregnancy and Childbirth* 2002; 2: 4.
12. Hromadnikova I, Vechetova L, Vesela K, Benešová B, Doucha J, et al. Neinvazivní RHD genotypizace plodu na DNA izolované z periferní krve RhD negativních těhotných žen. *Transfuzie a hematologie dnes* 2003; 4: 151–158.
13. Hromadnikova I, Benešová B, Vechetová L, Veselá K, Doucha J, Linhartová E, Vlk R. Neinvazivní RHD, RHC a RHE genotypizace plodu z periferní krve RhD negativních těhotných žen. *Transfuzie a hematologie dnes* 2004; 1: 13–17.
14. Hromadnikova I, Doucha J, Benešová B, Veselá K, Rožňáková E, Hakenová A. Neinvazivní RHC genotypizace plodu z periferní krve těhotných žen. *Transfuzie a hematologie dnes* 2005; 1: 14–16.
15. Hromadnikova I, Veselá K, Benešová B, Nekovářová K, Dušková D, et al. První zkušenosti s neinvazivní RH genotypizací plodu z periferní krve u aloimunizovaných těhotenství. *Transfuzie a hematologie dnes* 2005; 1: 17–20.

Doc. RNDr. Ilona Hromadniková, PhD.

Laboratoř buněčné biologie

Pediatrická klinika, 2. LF UK a FN Motol Praha

V úvalu 84

150 06 Praha 5

e-mail: ilona.hromadnikova@lfmotol.cuni.cz

Odesláno: 22. 11. 2005

Přijato: 2. 1. 2006