

## Neinvazivní RHc genotypizace plodu z periferní krve těhotných žen

Hromadníková I.<sup>1</sup>, Doucha J.<sup>3</sup>, Benešová B.<sup>2</sup>, Veselá K.<sup>1</sup>, Rožňáková E.<sup>2</sup>, Hakenová A.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Pediatrická klinika, <sup>2</sup>Krevní banka, <sup>3</sup>Gynekologicko-porodnická klinika, 2. LF UK a Fakultní nemocnice Motol, Praha,

<sup>4</sup>Transfuzní oddělení, Fakultní Thomayerova nemocnice, Praha

### Souhrn

V této prospektivní studii shrnujeme naše první zkušenosti s neinvazivní prenatalní RHc genotypizací plodu s využitím PCR v reálném čase, specifických primerů a TaqMan sondy navržených pro c alelu RHCE genu. Celkem bylo testováno 13 neoimunizovaných a 1 anti-c aloimunizovaných těhotných žen v rozmezí 12. až 33. týdne gravidity. Výsledky neinvazivní prenatalní RHc genotypizace plodu provedené na DNA extrahované z periferní krve matek jsme korelovali s výsledky imunohematologické analýzy pupečnickové krve. Výsledky RHc genotypizace plodu byly ve shodě s vyšetřením pupečnicku u všech vyšetřených těhotných žen. Neinvazivní prenatalní RHc genotypizace plodu umožňuje identifikaci plodů v riziku hemolytického onemocnění. Detekce Rhc negativních plodů u anti-c aloimunizovaných těhotenství může vyloučit potřebu invazivního prenatalního vyšetření.

**Klíčová slova:** fetální DNA, hemolytické onemocnění plodu, kvantitativní PCR v reálném čase, mateřská plazma, c alela, RHCE gen

### Summary

Hromadníková I., Doucha J., Benešová B., Veselá K., Rožňáková E., Hakenová A.: Non-invasive fetal RHc genotyping from maternal peripheral blood

In this prospective study, we described our first experience with non-invasive foetal RHc genotyping by analysis of DNA extracted from maternal plasma samples by using real-time PCR, specific primers and TaqMan probe targeted toward c allele of RHCE gene. We analysed 13 non-alloimmunised and 1 anti-c alloimmunised pregnant woman within 12<sup>th</sup> and 33<sup>rd</sup> week of pregnancy and correlated the results with serological analysis of cord blood. Non-invasive prenatal foetal RHc genotyping analysis of maternal plasma samples was in complete concordance with the analysis of cord blood in all pregnancies. Non-invasive foetal RHc genotyping enables the identification of foetuses at risk of haemolytic disease of the newborn. An identification of RHc negative foetuses in anti-c alloimmunized pregnancies may exclude the demand of invasive prenatal procedures.

**Key words:** foetal DNA, haemolytic disease of the newborn, quantitative real-time PCR, maternal plasma, c allele, RHCE gene

*Trans. Hemat. dnes, 11, 2005, No. 4, p. 14–16.*

### Úvod

V této prospektivní studii shrnujeme naše první zkušenosti s neinvazivní prenatalní RHc genotypizací plodu s využitím PCR v reálném čase, specifických primerů a TaqMan sondy navržených pro c alelu RHCE genu (1). RHc genotyp plodu může být určen u RhC homozygotní matky, jelikož mezi C a c alelou RHCE genu je rozdíl v 6 nukleotidech a tím zároveň ve 4 aminokyselinách (Cys16Trp, Ile60Leu, Ser68Asn and Ser103Pro), (11, 12). Pro detekci c alely RHCE genu jsme použili systém navržený pro Ser103Pro RhC/Rhc polymorfismus (1).

### Pacienti a metodika

Celkem bylo testováno 13 neoimunizovaných a 1 anti-c aloimunizovaných CC homozygotních těhotných žen v rozmezí 12. až 33. 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 dvěma různými protokoly (centrifugace 1200 x g a 3000 x g 10 min.). Poté byla plazma stočena znovu a skladována při  $\leq -80$  °C až do dalšího zpracování. Sekvence specifických primerů a TaqMan sondy použitých pro detekci c alely RHCE genu jsou v tabulce 1 (1).

Abychom minimalizovali riziko kontaminace vzorků, prováděli jsme veškeré zpracování biologického materiálu v laminárním boxu třídy II a pro pipetování jsme používali aerosol-rezistentní špičky (2, 3).

### Izolace DNA z mateřské plazmy

DNA byla extrahována z 400  $\mu$ l mateřské plazmy za použití QIAamp DNA Blood Mini Kitu (Qiagen, Hilden, Germany) podle pokynů výrobce. DNA byla eluována 50  $\mu$ l AE pufru a 5,0  $\mu$ l eluátu bylo použito pro amplifikaci c alely RHCE genu a 2,5  $\mu$ l pro detekci kontrolního  $\beta$ -globinového genu (2, 3).

**PCR v reálném čase**

RQ-PCR analýza byla provedena na ABI PRISM 7700 sekvenčním detekčním systému (Applied Biosystem, Branchburg, New Jersey, USA). PCR reakční směs (celkový objem 25  $\mu$ l) obsahovala TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem, Branchburg, New Jersey, USA), optimalizované primery (300 nM) a TaqMan sondu (200 nM). 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 15s (denaturace DNA) a 60 °C 1 min (anelace a syntéza DNA).

Každý vzorek DNA izolovaný z mateřské plazmy byl analyzován v 8jamkových prouzcích v 7 replikátech. Pozitivní výsledek byl hodnocen jako detekce fluorescenčního signálu v jamce před 40. cyklem ( $C_t < 40$ ), (2, 3).

**Výsledky**

Výsledky neinvazivní prenatalní *RHc* genotypizace plodu provedené na DNA extrahované z periferní krve matek jsme korelovali s výsledky imunohematologické analýzy pupečnickové krve (tab. 2). Výsledky *RHc* genotypizace plodu byly ve shodě s vyšetřením pupečnicku u všech vyšetřených těhotných žen. Amplifikace *RHc* alely na DNA extrahované ze 400  $\mu$ l mateřské plazmy se ve většině případů ale objevovala opožděně (mezi 38.

a 42. cyklem) ve srovnání se systémem používaným pro C alelu *RHCE* genu, který využívá specifických primerů navržených pro inzerci v intronu 2 *RHCE* genu (1). Proto doporučujeme *Rhc* genotypizaci plodu provádět na DNA extrahované z 800  $\mu$ l mateřské plazmy s finálním elučním objemem 50  $\mu$ l. Tímto krokem dojde k ještě většímu zkoncentrování DNA a ve směsném templátu mateřské a fetální DNA bude přítomno větší množství fetální DNA pro danou analýzu.

**Diskuse**

V případě *Rhc* inkompatibility matky a plodu, jestliže je matka *Rhc* negativní a plod po otci *Rhc* pozitivní, mohou erytrocyty plodu navodit aloimunizaci matky s následnou tvorbou anti-c protilátek, jež po průchodu placentární bariérou mohou zapříčinit hemolytické onemocnění plodu (4, 5).

Léčba aloimunizovaných těhotenství se v posledních letech koncentruje do center fetální medicíny. Kromě detekce mateřských aloprotilátek, sledování jejich titru a ultrasonografie, je kordocentéza hlavní diagnostickou metodou (stanovení krevní skupiny a krevního obrazu plodu) (4, 5). *RHc* genotyp plodu lze nyní určit neinvazivně v průběhu těhotenství z DNA izolované z periferní krve matky bez nutnosti provedení invazivních metod (biopsie choriových klků, amniocentéza, kordocentéza) za použití vysoce citlivé molekulárně biologické metody PCR v reálném čase (1). Během těhotenství cirkuluje

**Tab. 1.** Sekvence specifických primerů a TaqMan sondy použitých pro detekci c alely *RHCE* genu.

Gen	Primery	TaqMan sonda	citace
<i>RHCE</i> c alela	5'-TCGGCCAAGATCTGACCG-3' 5'-ATGACCACCTTCCCAGG-3'	5'-(FAM) CTTCTCACCTCAAATTC CGGAGA (TAMRA)-3'	1

**Tab. 2.** Neinvazivní *RHc* genotypizace plodu na fetální DNA přítomné v mateřské plazmě u těhotných žen (prospektivní studie).

PČ	IČ	Týden gravidity	<i>RHCE</i> c alela plazma	<i>Rhc</i> pupečník	anti-c
1	978A	12	+	+	ne
	978B	16	+	+	ne
2	993	12	-	-	ne
3	998	33	+	+	ne
4	1036	13	+	+	ne
5	1072A	12	-	-	ne
	1072B	16	-	-	ne
6	1078A	12	+	+	ne
	1078B	16	+	+	ne
7	1087	12	-	plod A:- plod B:- plod C:-	ne
8	1100	12	+	+	ne
9	1120	16	+	+	ne
10	1123	13	+	+	ne
11	1146	12	+	+	ne
12	1208	12	+	+	ne
13	1235	28	-	-	Anti-c: NAT = 16 HON ne
14	1236A	12	+	+	ne
	1236B	16	+	+	ne

v mateřské periferní krvi extracelulární fetální DNA (6-8) jako důsledek obnovy buněk placenty a destrukce fetálních buněk imunitním systémem matky, které přecházejí přes placentu do mateřské cirkulace. Vzhledem k přítomnosti jak mateřské tak fetální DNA v mateřské krvi je však možné detekovat pouze paternální alely (9, 10).

Detekce Rhc negativních plodů v současné graviditě může vyloučit potřebu invazivního prenatálního vyšetření, neboť anti-c protilátky mohou v mateřské cirkulaci přetrvávat z předchozího období z mnoha důvodů (4, 5).

*Poděkování*

*Tato práce vznikla za podpory VZ 2. LF UK č. 111300003 a MSM 00216 20806*

## Literatura

1. **Legler TJ, Lynen R, Maas JH, Pindur G, Kulenkampff D, Suren A, Osmers R, Kohler M.** Prediction of fetal RhD and Rh CcEe phenotype from maternal plasma with real-time polymerase chain reaction. *Transfus Apheresis Sci* 2002; 27: 217-223.
2. **Hromadníková I, Vechetová L, Veselá K, Benešová B, Doucha J, Linhartová E, Vlk R, Kulovaný E.** Neinvazivní RHD genotypizace plodu na DNA izolované z periferní krve RhD negativních těhotných žen. *Transfuze a hematologie dnes* 2003; 4: 151-158.
3. **Hromadníková 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. *Transfuze a hematologie dnes* 2004; 1: 13-17.
4. **Žižka Z, Calda P.** Prevence, diagnostika a léčba erytrocytární aloimunizace v těhotenství. *Moderní gynekologie a porodnictví* 1998; 7(2).
5. **Avent ND, Reid ME.** The Rh blood group system: a review. *Blood* 2000; 95: 375-387.
6. **Poon LL, Lo YM.** Circulating fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chim Acta* 2001; 313: 151-155.
7. **Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Sargent JL.** Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350: 485-487.
8. **Lo YMD, Tein MSC, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PMK, Wainscoat JS, Johnson PJ, Chang AMZ, Hjelm NM.** Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum. Implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 768-775.
9. **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(2): 112-116.
10. **Zhong XY, Hahn S, Holzgreve W.** Prenatal identification of fetal genetic traits. *Lancet* 2001; 357: 310-311.
11. **Mouro I, Colin Y, Cherif-Zahar B, Cartron JP, Le Van Kim C.** Molecular genetic basis of the human Rhesus blood group system. *Nat Genet* 1993 Sep; 5(1): 62-5.
12. **Avent ND.** Human erythrocyte antigen expression: its molecular bases. *Br J Biomed Sci* 1997 Mar; 54(1): 16-37.

*RNDr. I. Hromadníková, PhD.  
Laboratoř buněčné biologie  
Pediatrická klinika, 2. LF UK a FN Motol Praha  
V úvalu 84  
150 06 Praha 5*

*Došlo do redakce: 16. 11. 2004*

*Přijato: 24. 1. 2005*

**Katalog kongresů, konferencí, symposií a přednášek počínaje rokem 2005** nebude vycházet ve své tradiční tištěné podobě, ale elektronicky. Akce odborných lékařských společností a spolků ČLS JEP najdete na adrese [www.cls.cz/katalog](http://www.cls.cz/katalog).