

Abstrakt

Digitální PCR (Polymerase Chain Reaction) je metoda umožňující absolutní kvantifikaci sekvencí DNA a proto nachází uplatnění v mnoha diagnostických disciplínách. Zaměřili jsme se na diagnostiku trisomie 21. chromosomu, která se projevuje jako Downův syndrom. Informace o genomu plodu lze získat z volné fetální DNA, která se během těhotenství uvolňuje do krevního řečiště matky z placenty. V prvním trimestru fetální DNA tvoří přibližně 5–10 % volné DNA a je tudíž vhodným cílem pro neinvazivní prenatální testování (NIPT). Potřebujeme však techniku, která je schopna rozlišit tuto relativně malou frakci volné fetální DNA a odlišit ji od volné DNA matky. Právě digitální PCR poskytuje díky širokým možnostem multiplexování různé způsoby, jak tohoto cíle dosáhnout. Zaměřili jsme se na optimalizaci multiplex reakce, která v jednom fluorescenčním kanále rozlišuje počet kopií referenčního chromosomu 18 a sledovaného chromosomu 21. Výsledné stanovení tohoto poměru nám poskytuje informaci ohledně rovnováhy mezi chromosomy a může nám tak potvrdit či vyvrátit přítomnost trisomické fetální frakce. Využitelnost navržené metody pro klinickou aplikaci jsme testovali vyšetřením vzorků DNA izolovaných z 25 vzorků plazmy těhotných se zdravými plody a z 15 vzorků plazem od těhotných s plody postiženými Downovým syndromem. Analýza křivky operační charakteristiky přijímače (ROC) získaných dat vedla ke stanovení cut-off hodnoty naměřeného poměru 1,144 pro dosažení senzitivity 73,3 % a specifity 80 %. Vytypovali jsme metodické přístupy s potenciálem dále zlepšit parametry vyvíjeného testu.

Klíčová slova: ddPCR, NIPT, duplexing, Downův syndrom, optimalizace, prenatální diagnostika, aneuploidie