

Etablierung einer Methode zur Detektion maternalen Kontamination in der molekulargenetischen Pränataldiagnostik: Vergleich des GenePrint® 24 System Kits von Promega mit dem Devyser Compact v3 Kit von Devyser zur Fragmentanalyse

Leonora, Shate Rechi, 18-21 A

Biomedizinische Analytik HF

1. Zusammenfassung

Durch die verschiedene Entnahmetechniken in der pränatalen Diagnostik kann es zur Kontamination der fötalen Probe mit mütterlichem Blut oder mütterlicher Dezidua kommen. Da bereits geringe Mengen maternaler Desoxyribonukleinsäure (DNS) in einer fötalen Probe die Ergebnisse genetischer Analysen beeinflussen können, ist es essenziell eine potentielle maternale Kontamination auszuschliessen. Die Probe des Fötus und die der Mutter werden anhand sogenannten Short Tandem Repeats (STR) verglichen. STR sind tandemartig wiederholende nichtkodierende Sequenzen, die bei jedem Individuum in unterschiedlichen Längen vorkommen. Die Analyse basiert auf der quantitativen Fluoreszenz-Polymerasekettenreaktion (qf-PCR) und einer anschliessenden Kapillarelektrophorese. Das GenePrint® 24 System Kit von Promega wurde mit dem Devyser Compact v3 Kit von Devyser verglichen. Beide Kits enthalten verschiedene Primermixe, welche 23 Loci abdecken. Das GenePrint® 24 Kit von Promega konnte aufgrund verschiedener Kriterien überzeugen.

2. Einleitung

Die Amniozentese und die Chorionzottenbiopsie sind die Hauptentnahmetechniken in der Pränataldiagnostik. Durch den beiden Entnahmemethoden kann eine genauere Aussage zum genetischen Hintergrund des Ungeborenen gemacht werden. Eine präanalytische Schwierigkeit, die bei einer Amniozentese bzw. eine Chorionzottenbiopsie auftreten kann, ist die Kontamination der fötalen Probe mit der DNS der Mutter. Während der Entnahme kann die Probe mit mütterlichem Blut oder mit der mütterlichen Dezidua vermischt werden, was bei einem gesunden Ungeborenen mit einer genetisch auffälligen Mutter bedeutende Folgen haben kann [1]. Bisher stand der medizinischen Genetik am Kantonsspital Aarau (KSA) keine etablierte Methode zur Detektion einer maternalen Kontamination zur Verfügung. Daher musste eine Kontamination von externen Labors ausgeschlossen werden, bevor die Pränataldiagnostik am KSA durchgeführt werden konnte.

Die hier verglichenen Analysekits basieren auf dem Prinzip der quantitativen Fluoreszenz-Polymerasekettenreaktion (qf-PCR) von Mikrosatelliten. Die Anzahl dieser Wiederholungen variiert bei jedem Menschen und dient als ein gutes Differenzierungsmittel zwischen zwei Individuen [2;3]. Das Hauptziel dieser Arbeit, war eine 10%ige maternale Kontamination zuverlässig mit dem bestgeeigneten Kit für das Labor zu detektieren.

3. Ziele und Fragestellungen

Ziel: Das Herausfinden, welches der beiden Kits in der Routine eingesetzt werden kann.

Fragestellung 1: Können beide Kits eine maternale Kontamination von 10% zuverlässig detektieren?

Fragestellung 2: Liefern die beiden Kits vergleichbare Resultate bezüglich der Handhabung im Labor, der Zeitaufwand und der Wirtschaftlichkeit?

Fragestellung 3: Welcher der beiden Kits kann bezüglich der Handhabung im Labor, der Zeitaufwand und der Wirtschaftlichkeit in der Routine eingesetzt werden?

4. Material, Methodik, Vorgehen

- Aus EDTA-Vollblut extrahierter DNS von einer Mutter und ihrem Kind (keine chromosomale Anomalien bekannt)
- Die beiden getesteten Kits sind mit über 20 Markern gut ausgerüstet und können 23 Loci abdecken

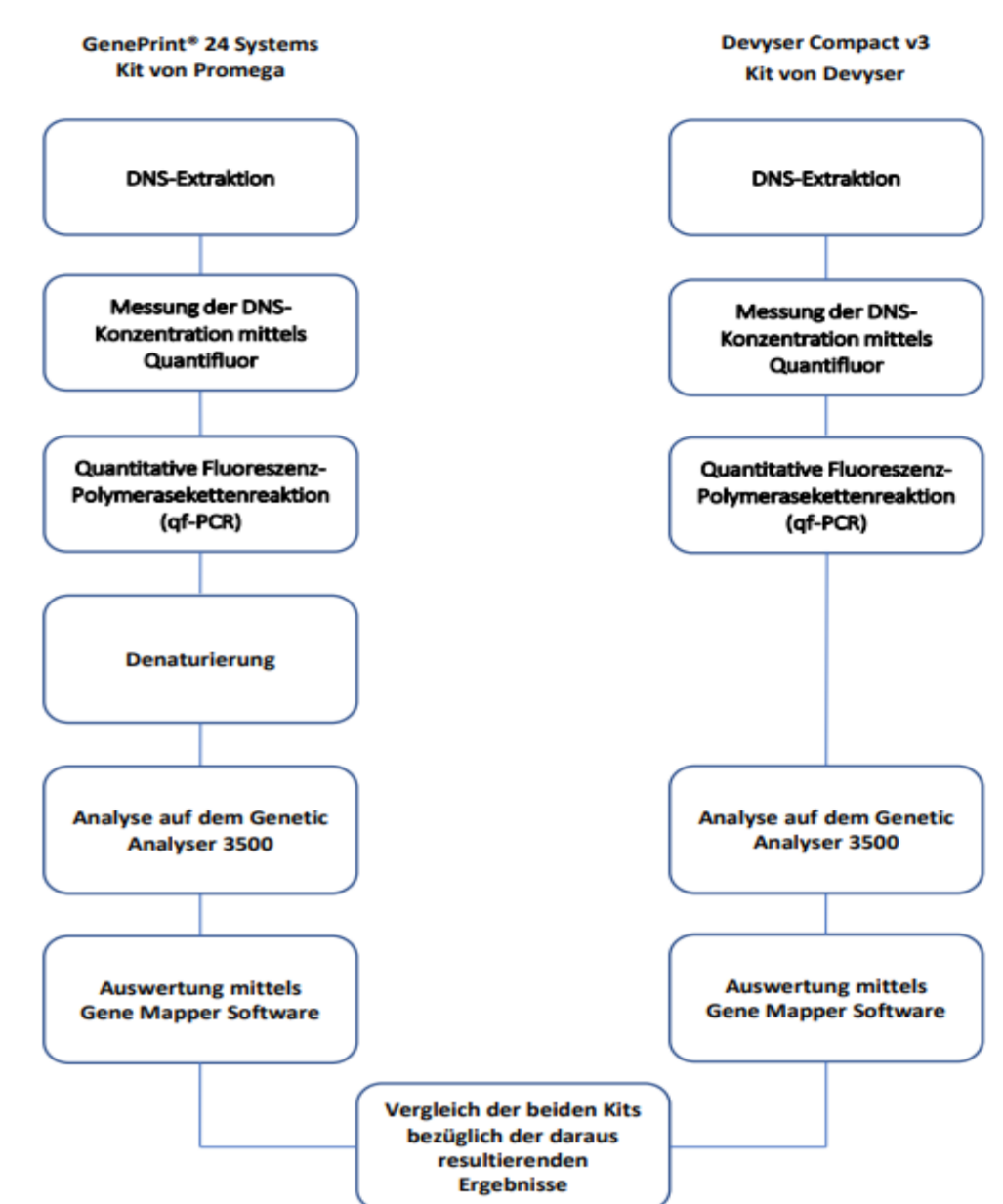


Abb. 1 Die Darstellung des groben Arbeitsablaufs vom GenePrint® 24 System Kit von Promega (links) und vom Devyser Compact v3 Kit von Devyser [4]

5. Ergebnisse/ Resultate

Die Ergebnisse zeigten, dass man aus dem GenePrint® 24 Kit 10 und aus dem Devyser Compact v3 Kit 17 informativen Marker analysieren konnte.

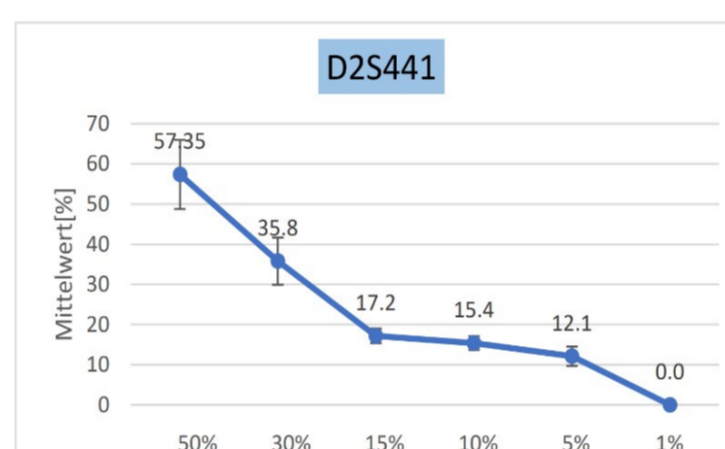


Abb. 2 Darstellung der gelieferten Resultate aus dem Marker D2S441. Die Y-Achse ermittelt den Mittelwert der maternalen Kontamination aus den vier Läufen, die X-Achse ermittelt den zu erwarteten Kontaminationsgrad [5]

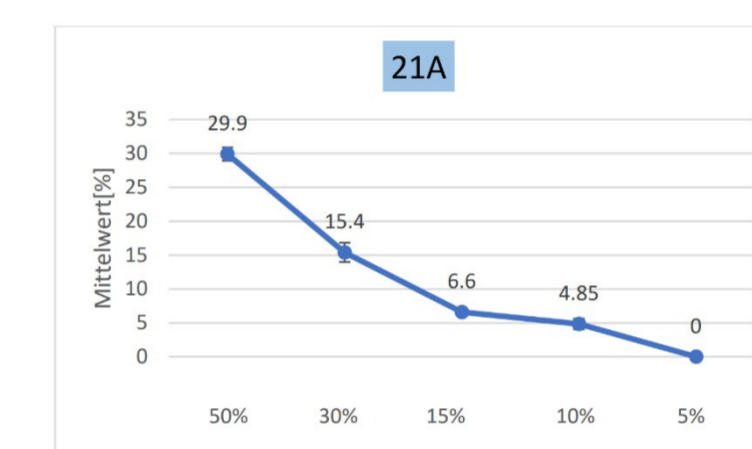


Abb. 3 Darstellung der gelieferten Resultate aus dem Marker 21A. Die Y-Achse ermittelt den Mittelwert der maternalen Kontamination aus den zwei Läufen, die X-Achse ermittelt den zu erwarteten Kontaminationsgrad [6]

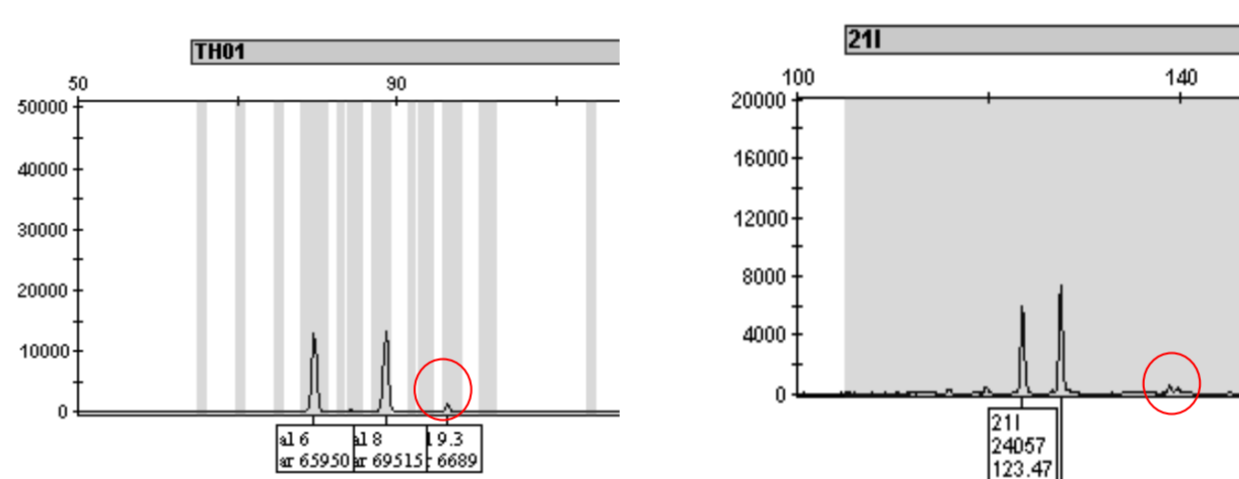


Abb. 4 Darstellung eines Kontaminationsallels bei einer 10%igen Kontamination in Rot eingekreist (links aus dem GenePrint® 24 System und rechts aus dem Devyser Compact v3 Kit) [7]

	GenePrint® 24 System Kit von Promega	Devyser Compact v3 Kit von Devyser
Zeitvergleich	<ul style="list-style-type: none"> 6:2 min (praktische Arbeit) 1h:11m:30s (Cycler Programm) 4 min Denaturierung 80 min (Kapillarelektrophorese) 	<ul style="list-style-type: none"> 5:8 min (praktische Arbeit) 2h:48m:30s (Cycler Programm) 40min (Kapillarelektrophorese)
Kostenvergleich	Total: 2.7 h CHF 1970 (100 Reaktionen) 1/100=0.01 0.01*1970= CHF 19.7 (pro Reaktion)	Total: 3.6 h CHF 3200 (100 Reaktionen) 1/100=0.01 0.01*3200= CHF 32 (pro Reaktion)
	(Haltbarkeit: 1 Jahr bei 2-10 °C)	(Haltbarkeit: Das aktivierte Reaktionsgemisch mindestens 7 Tage bei 2-8 °C oder unter -18 °C mindestens 90 Tage)

Tab. 1 Darstellung der Kosten- und Zeitvergleich von beiden Kits [8]

6. Diskussion

Fazit der Fragestellung 1: Nur das GenePrint® 24 System Kit von Promega kann zuverlässig eine maternale Kontamination von 10% detektieren.

Fazit der Fragestellung 2 : Bezüglich der Handhabung im Labor und der Zeitaufwand liefern die beide Kits vergleichbare Resultate, aber bezüglich der Wirtschaftlichkeit ist das Kit von Devyser für das Laborbudget extrem nachhaltig.

Fazit der Fragestellung 3: Das GenePrint® 24 System Kit von Promega ist anhand der Handhabung, der Zeitaufwand und der Wirtschaftlichkeit für das Labor in der Routine am besten einsetzbar.

Aufgrund der zuverlässigen Ergebnisse aus dem GenePrint® 24 System Kit, wird dieses im Labor der medizinischen Genetik des Instituts für Labormedizin des Kantonsspital Aarau eingesetzt. Man konnte die erwünschte 10%ige maternale Kontamination bei allen 4 Läufen und bei allen zehn informativen Markern detektieren.

Referenzen

- [1] Lamb, A. N., Rosenfeld, J. A., Coppinger, J., Dodge, E. T., Dabell, M. P., Torchia, B. S., Ravnán, J. B., Shaffer, L. G. & Ballif, B. C. (2012). Defining the impact of maternal cell contamination on the interpretation of prenatal microarray analysis. *Genet Med*, 14(11), 914-21.
- [2] Arnemann, J. (2018). Short Tandem Repeat (STR). *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer Reference Medizin. Berlin, Heidelberg: Springer Reference.
- [3] Brinkmann, B. (23. August 2004). *Forensische DNA Analytik*. Deutsches Ärzteblatt, S. A2329-2330
- [4] Shate Rechi, L. (2021). Die Darstellung des groben Arbeitsablaufs vom GenePrint® 24 System Kit von Promega (links) und vom Devyser Compact v3 Kit von Devyser (rechts): Eigene Abbildung
- [5] Shate Rechi, L. (2021). Darstellung der gelieferten Resultate aus dem Marker D2S441. Die Y-Achse ermittelt den Mittelwert der maternalen Kontamination aus den vier Läufen, die X-Achse ermittelt den zu erwarteten Kontaminationsgrad: Eigene Abbildung
- [6] Shate Rechi, L. (2021). Darstellung der gelieferten Resultate aus dem Marker 21A. Die Y-Achse ermittelt den Mittelwert der maternalen Kontamination aus den zwei Läufen, die X-Achse ermittelt den zu erwarteten Kontaminationsgrad: Eigene Abbildung
- [7] Shate Rechi, L. (2021). Darstellung eines Kontaminationsallels bei einer 10%igen Kontamination in Rot eingekreist (links aus dem GenePrint® 24 System und rechts aus dem Devyser Compact v3 Kit): Eigene Abbildung
- [8] Shate Rechi, L. (2021). Darstellung der Kosten- und Zeitvergleich von beiden Kits: Eigene Tabelle