TRANSFUZE 5.4.2005 11:34 Stránka 14
proLékaře.cz | 6.9.2025

Neinvazivní RHc genotypizace plodu z periferní krve těhotných žen

Hromadníková I.[1], Doucha J.[3], Benešová B.[2] , Veselá K.[1], Rožňáková E.[2], Hakenová A.[4]
[1]Pediatrická klinika, [2]Krevní banka, [3]Gynekologicko-porodnická klinika, 2. LF UK a Fakultní nemocnice Motol, Praha, [4]Transfuzní oddělení, Fakultní Thomayerova nemocnice, Praha

Souhrn
V této prospektivní studii shrnujeme naše první zkušenosti s neinvazivní prenatální *RHc* genotypizací plodu s využitím PCR v reálném čase, specifických primerů a TaqMan sondy navržených pro c alelu *RHCE* genu. Celkem bylo testováno 13 nealoimunizovaných a 1 anti-c aloimunizovaných těhotných žen v rozmezí 12. až 33. týdne gravidity. Výsledky neinvazivní prenatální *RHc* genotypizace plodu provedené na DNA extrahované z periferní krve matek jsme korelovali s výsledky imunohematologické analýzy pupečníkové krve. Výsledky *RHc* genotypizace plodu byly ve shodě s vyšetřením pupečníku u všech vyšetřených těhotných žen. Neinvazivní prenatální *RHc* genotypizace plodu umožňuje identifikaci plodů v riziku hemolytického onemocnění. Detekce Rhc negativních plodů u anti-c aloimunizovaných těhotenství může vyloučit potřebu invazivního prenatálního 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 12th and 33rd 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 prenatální *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 nealoimunizovaných 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 ≤ -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 µl mateřské plazmy za použití QIAamp DNA Blood Mini Kitu (Qiagen, Hilden, Germany) podle pokynů výrobce. DNA byla eluována 50 µl AE pufru a 5,0 µl eluátu bylo použito pro amplifikaci c alely *RHCE* genu a 2,5 µl pro detekci kontrolního ß-globinového genu (2, 3).

proLékaře.cz | 6.9.2025

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 µl) 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 proužcích v 7 replikátech. Pozitivní výsledek byl hodnocen jako detekce fluorescenčního signálu v jamce před 40. cyklem (Ct < 40), (2, 3).

Výsledky

Výsledky neinvazivní prenatální *RHc* genotypizace plodu provedené na DNA extrahované z periferní krve matek jsme korelovali s výsledky imunohematologické analýzy pupečníkové krve (tab. 2). Výsledky *RHc* genotypizace plodu byly ve shodě s vyšetřením pupečníku u všech vyšetřených těhotných žen. Amplifikace *RHc* alely na DNA extrahované ze 400 µl 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 µl mateřské plazmy s finálním elučním objemem 50 µl. 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
RHCE c alela	5‘-TCGGCCAAGATCTGACCG-3‘ 5‘-ATGACCACCTTCCCAGG-3‘	5‘-(FAM) CTTCCTCACCTCAAATTTC 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	*RHCE c* alela plazma	Rhc 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

proLékaře.cz | 6.9.2025

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, sympozií 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.**