TRANSFUZE 5.4.2005 11:34 Stránka 17
proLékaře.cz | 20.11.2026

První zkušenosti s neinvazivní RH genotypizací plodu z periferní krve u aloimunizovaných těhotenství

Hromadníková I.[1], Veselá K.[1], Benešová B.[2], Nekovářová K.[4], Dušková D.[5], Vlk R.[3], Špálová I.[3], Gerychová R.[6], Hakenová A.[8], Janoušková M.[9], Rosenbaumová Z.[10], Vlašín P.[11], Vlachová A.[12], Smejkal P.[7], Palásek V.[13], Langrová E.[14], Rožňáková E.[2], Calda P.[4]

[1] Pediatrická klinika, [2]Krevní banka, [3]Gynekologicko-porodnická klinika, 2. LF UK a Fakultní nemocnice Motol, Praha, [4]Gynekologicko-porodnická klinika a [5]Transfuzní oddělení, VFN a 1. LF UK, Praha, [6]Gynekologicko-porodnická klinika a [7]Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice Brno, [8]Transfuzní oddělení, Fakultní Thomayerova nemocnice, Praha, [9]Transfuzní oddělení, Nemocnice Karlovy Vary, [10]Ženská klinika, Masarykova nemocnice v Ústí n. L., [11]Gynekologická a ultrazvuková ambulance, Centrum prenatální diagnostiky, Brno, [12] Transfuzní oddělení, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, [13]Gynekologicko-porodnické oddělení a [14]Hematologicko-transfuzní oddělení, Nemocnice Kladno

Souhrn

V této prospektivní studii shrnujeme naše první zkušenosti s neinvazivní prenatální RH genotypizací plodu u aloimunizovaných těhotenství s využitím PCR v reálném čase, specifických primerů a TaqMan sond navržených pro *RHD* a *RHCE* geny. Celkem bylo testováno 22 aloimunizovaných těhotných žen (15 anti-D, 5 anti-D+C, 2 anti-E) v rozmezí 11. až 33. týdne gravidity. Výsledky neinvazivní prenatální *RHD* a *RHCE* genotypizace plodu provedené na DNA extrahované z periferní krve matek jsme korelovali s výsledky imunohematologické analýzy pupečníkové krve. Výsledky *RHD* a *RHCE* genotypizace plodu byly ve shodě s vyšetřením pupečníku u všech vyšetřených aloimunizovaných těhotných žen. Neinvazivní prenatální *RHD* a *RHCE* genotypizace plodu umožňuje identifikaci plodů v riziku hemolytického onemocnění. Detekce negativních plodů v současné graviditě může vyloučit potřebu invazivního prenatálního vyšetření.

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

Summary

Hromadníková I., Veselá K., Benešová B., Nekovářová K. , Dušková D. , Vlk R., Špálová I., Gerychová R., Hakenová A., Janoušková M., Rosenbaumová Z., Vlašín P., Vlachová A., Smejkal P., Palásek V., Langrová E., Rožňáková E., Calda P.: First experience with non-invasive foetal RH genotyping from maternal peripheral blood in alloimmunised pregnancies

In this prospective study, we described our first experience with non-invasive foetal RH genotyping in alloimmunised pregnancies by analysis of DNA extracted from maternal plasma samples by using real-time PCR and primers and probes targeted toward *RHD* and *RHCE* genes. We analysed 22 alloimmunised pregnant women (15 anti-D, 5 anti-D+C, 2 anti-E) within 11th and 33rd week of pregnancy and correlated the results with serological analysis of cord blood. Non-invasive prenatal foetal *RHD* and *RHCE* genotyping analysis of maternal plasma samples was in complete concordance with the analysis of cord blood in all alloimmunised pregnancies. Non-invasive foetal *RHD* and *RHCE* genotyping enables the identification of foetuses at risk of haemolytic disease of the newborn. An identification of negative foetuses may exclude the demand of invasive prenatal procedures.

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

Trans. Hemat. dnes, 2005, 11, No. 4, p. 17–20.

Úvod

V této prospektivní studii shrnujeme naše první zkušenosti s neinvazivní prenatální *RHD* a *RHCE* genotypizací plodu u aloimunizovaných těhotenství s využitím PCR v reálném čase, specifických primerů a TaqMan sond navržených pro *RHD* a *RHCE* geny.

Pacienti a metodika

Celkem bylo testováno 22 aloimunizovaných těhotných žen (15 anti-D, 5 anti-D+C, 2 anti-E) v rozmezí 11. 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 po dobu 10 min.). Poté byla plazma stočena znovu a skladována při teplotě ≤ -80 °C až do dalšího zpracování (1, 2).

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

proLékaře.cz | 20.11.2026

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 alel *RHD* a *RHCE* genu a 2,5 µl pro detekci kontrolního ß-globinového genu (1, 2).

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) a optimalizované primery (200 nM a 300 nM) a TaqMan sondy (100 nM a 200 nM). Podmínky PCR reakce byly nastaveny podle manuálu výrobce (2min. preinkubace při 50 °C potřebná pro aktivaci AmpErase Uracil N-glykosylázy s následnou 10min. 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 proužcích v 7 replikátech. Pozitivní výsledek byl hodnocen jako detekce fluorescenčního signálu v jamce před 40. cyklem (Ct < 40), (1, 2).

Tab. 1. Neinvazivní *RHD* genotypizace plodu na fetální DNA přítomné v mateřské plazmě u RhD negativních anti-D aloimunizovaných těhotných žen (prospektivní studie).

	IČ	Týden gravidity	RHD exon 10 plazma	RHD exon 7 plazma	RhD pupečník	anti-D titr kordocentéza HON, terapie
1	2	27	-	-	-	NAT = 16, ET = 32 kordo ne, HON ne
2	952	23	+	+	+	NAT = 512, ET = 32 kordo ano, HON ano, hyperbilirubinemie, intenzivní fototerapie
3	997	17	-	-	-	NAT = 1024 kordo ne, HON ne
4	1041A	17	+ nízká hladina	+ fetální DNA	+	NAT = 1024, ET = 512 kordo ne, HON ano, hyperbilirubinemie, intenzivní fototerapie
	1041B	22	+ nízká hladina	+ fetální DNA	+	NAT = 512, ET = 256 kordo ne, HON ano, hyperbilirubinemie, intenzivní fototerapie
5	1091	12+3	-	-	-	NAT = 2, ET = 2 kordo ne, HON ne
6	1109	20+4	+ nízká hladina	+ fetální DNA	+	NAT = 64, ET = 16 kordo ano (2x), HON ano, intrauterinní TRF, hyperbilirubinemie, intenzivní fototerapie
7	1143	28	+	+	+	NAT = 8, ET = 4 kordo ne, HON ne
8	1164	24+6	+	+	D weak	NAT = 2, ET = 4 kordo ne, hyperbilirubinemie, fototerapie
9	1178	22	+	+	+	NAT = 512, ET = 128 kordo ano (2x), hyperbilirubinemie, intenzivní fototerapie, transfuze erytrocytů (1x)
10	1195	15	+	+	+	NAT = 256, ET = 16 kordo ano, HON ano, intrauterinní transfuze
11	1198	33	+	+	+	NAT = 32 kordo ne, hyperbilirubinémie, fototerapie
12	1213	25	+	+	+	NAT = 512 kordo ne, hyperbilirubinemie, intenzivní fototerapie
13	1214	30	+	+	gemini A: + B: +	NAT = 2, ET = 2 AMC ano, kordo ne, HON ne
14	1243	31	-	-	-	NAT = 128, ET = 8 kordo ne, HON ne
15	1245	31	-	-	-	NAT = 2, kordo ne, HON ne

Vysvětlivky: kordo = kordocentéza; NAT = nepřímý antiglobulinový test; ET = enzymový test; HON = hemolytické onemocnění novorozence; AMC = amniocentéza

proLékaře.cz | 20.11.2026

Výsledky

Výsledky neinvazivní prenatální *RHD* a *RHCE* genotypizace plodu provedené na DNA extrahované z periferní krve matek jsme korelovali s výsledky imunohematologické analýzy pupečníkové krve (tab. 1-3). Výsledky *RHD* a *RHCE* genotypizace plodu byly ve shodě s vyšetřením pupečníku u všech vyšetřených aloimunizovaných těhotných žen.

Diskuse

Neinvazivní prenatální *RHD* a *RHCE* genotypizace plodu umožňuje identifikaci plodů v riziku hemolytického onemocnění.

Pro bezpečné stanovení *RHD* genotypizace plodu jsme navrhli systém provedení amplifikace *RHD* genu v oblasti exonu 7 (7 replikátů DNA izolované z jedné alikvoty mateřské plazmy) a exonu 10 (7 replikátů DNA izolované z druhé alikvoty mateřské plazmy), (3, 4). Pro *RHCE* genotypizaci plodu používáme systém specifických primerů a TaqMan sond pro oblast intronu 2 (C alela) a exonu 5 (E alela) *RHCE* genu, navržených Leglerem et al. (4). V případě *RHCE* genotypizace testujeme vždy 7 replikátů DNA izolované ze dvou různých alikvot mateřské plazmy. Pokud vyjde negativní výsledek, provádíme analýzu na DNA izolované z dalších dvou alikvot mateřské plazmy. Při negativním výsledku i z druhé analýzy uzavíráme, že plod by měl být RhD, RhC a nebo RhE negativní. Takto vyšetříme celkem 1,6

Tab. 2. Neinvazivní *RHD, RHC* a *RHE* genotypizace plodu na fetální DNA přítomné v mateřské plazmě u RhD negativních anti-D+C aloimunizovaných těhotných žen (prospektivní studie).

	IČ	Týden gravidity	RHD exon 10 plazma	RHD exon 7 plazma	RHCE C alela plazma	RHCE E alela plazma	Rh fenotyp pupečník	anti-D+C titr kordocentéza HON, terapie
1	836A	11	-	-	-		ccddee	anti-D: NAT = 4096, ET = 1024 anti-C: NAT = 64, ET = 32
	836 B	14	-	-	-	-		anti-D: NAT = 1024, ET = 512 anti-C: NAT = 32, ET = 64
	836C	21	-	-	-	-		anti-D: NAT = 2048, ET = 1024 anti-C: NAT = 32, ET = 64
	836D	30	-	-	-	-		anti-D: NAT = 2048, ET = 2048 anti-C: NAT = 32, ET = 128 kordo ne, HON ne
2	846	24	+	+	+	-	CcDee	anti-D: NAT = 16, ET = 32 anti-C: NAT = 32, ET = 64 kordo ne, HON ne
3	939	18	+	+	+	-	CcDee	mrtvý plod v předchozí grav. , anti-D: NAT = 4096, ET = 512 anti-C: NAT = 512, ET = 256 kordo ano, HON ano, intrauterinní TRF (3x)
4	1151	17	+	+	-	+	ccDEe	anti-D: NAT = 8 anti-C: NAT = 128 HON ano, hyperbilirubinemie, intenzivní fototerapie
5	1156	28	+	+	+	-	CcDee	anti-D: NAT = 512, ET = 16 anti-C: NAT = 8, ET = neg. kordo ne, HON ano, hyperbilirubinemie, intenzivní fototerapie

Vysvětlivky: kordo = kordocentéza; NAT = nepřímý antiglobulinový test; ET = enzymový test; HON = hemolytické onemocnění novorozence; TRF = transfuze

Tab. 3. Neinvazivní *RHE* genotypizace plodu na fetální DNA přítomné v mateřské plazmě u anti-E aloimunizovaných těhotných žen (prospektivní studie).

	IČ	Týden gravidity	RHCE E alela plazma	β-globin plazma	RhE plodu	anti-E titr kordocentéza HON, terapie
1	979	14	+	+	+	NAT = 4, ET = 128 kordo ne, HON ne
2	1196	28	+	+	+	NAT = 32, ET = 16 kordo ne, HON ne

Vysvětlivky: kordo = kordocentéza; NAT = nepřímý antiglobulinový test; ET = enzymový test; HON = hemolytické onemocnění novorozence; TRF = transfuze

TRANSFUZE 5.4.2005 11:34 Stránka 20
proLékaře.cz | 20.11.2026

ml mateřské plazmy a minimalizujeme riziko falešně negativního výsledku. Současně kontrolujeme přítomnost DNA ve vzorku (správná DNA izolace) a účinnost PCR reakce (nepřítomnost inhibitorů PCR reakce) amplifikací kontrolního β-globinového genu (GLO), který detekuje zároveň cyklus amplifikace (Ct) celkové DNA přítomné v mateřské plazmě. Amplifikaci *RHD* a *RHCE* genu na DNA extrahované z mateřské plazmy provádíme společně se systémem pozitivních kontrol (pozitivní amplifikace *RHD* a *RHCE* genu u RhD, RhC a RhE pozitivního jedince) a negativních kontrol (nepřítomnost amplifikace *RHD* a *RHCE* genu na reakční směsi bez templátu a u RhD, RhC a RhE negativního jedince).

V případě potřeby provádíme toto vyšetření na konci I. trimestru gravidity (od 10. týdne těhotenství). Jelikož v průběhu těhotenství podíl fetální DNA v mateřské cirkulaci narůstá (5-7), doporučujeme provádět nebo opakovat určení *RHD* a *RHCE* genotypu plodu ve 2. nebo 3. trimestru gravidity.

U 2 anti-D aloimunizovaných těhotných žen jsme zaznamenali i po opakovaných analýzách velmi nízký výskyt fetální DNA v mateřské cirkulaci (P1041, P1109). U ostatních aloimunizovaných pacientek byla fetální DNA přítomna v mateřské plazmě ve stejném množství jako u nealoimunizovaných těhotenství.

V případě detekce RhD a/nebo RhC pozitivního plodu u aloimunizovaného těhotenství (přítomnost anti-D, anti-D+C, anti-C protilátek z období před otěhotněním) je nutné sledovat v pravidelných intervalech změny titru aloprotilátek, ultrazvukem stav plodu a v případě nutnosti včas provést kordocentézu pro určení krevního obrazu plodu (8).

Detekce RhD a RhC negativních plodů v současné graviditě může vyloučit potřebu invazivního prenatálního vyšetření, neboť anti-D, anti-D+C, anti-C protilátky mohou v mateřské cirkulaci přetrvávat z předchozího období z mnoha důvodů (8, 9).

Poděkování
Tato práce vznikla za podpory VZ 2. LF UK č. 111300003 a MSM 0021620 806.

Literatura

1. **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.
2. **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.
3. **Lo YMD, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, Poon PM, Redman CW, Wainscoat JS.** 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, 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.
5. **Poon LL, Lo YM.** Circulating fetal DNA in maternal plasma. Clin Chim Acta 2001; 313: 151-155.
6. **Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Sargent JL.** Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet 1997; 350: 485-487.
7. **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.
8. **Žižka Z., Calda P.** Prevence, diagnostika a léčba erytrocytární aloimunizace v těhotenství. Moderní gynekologie a porodnictví 1998; 7(2).
9. **Avent ND, Reid ME**. The Rh blood group system: a review. Blood 2000; 95: 375-387.

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

OZNÁMENÍ ODBORNÉ AKCE

Česká společnost pro analytickou cytologii (ČSAC) pořádá ve dnech 22. - 26. června 2005 již třetí v sérii úspěšných konferencí určených teoreticky, experimentálně i prakticky zaměřeným pracovníkům výzkumných ústavů, klinických pracovišť a vysokých škol, kteří mají zájem o nejprogresivnější metodologie z oblasti analytické cytologie. Konference **„Analytická cytometrie III“** za účasti předních zahraničních specialistů se bude konat v atraktivním prostředí horského hotelu Červenohorské sedlo v pohoří Hrubého Jeseníku. Další informace budou postupně uveřejňovány na webovské stránce ČSAC: http://www.ibp.cz/conferences/cytometrie/index.html