

Efektivita stanovení *KEL* a *RHCE* genotypu plodu u aloimunizovaných žen minisekvenací

The effectiveness of *KEL* and *RHCE* fetal genotype assessment in alloimmunized women by minisequencing

Durdová V.¹, Böhmová J.², Kratochvílová T.¹, Vodička R.², Holusková I.³, Langová K.⁴, Lubušský M.¹

¹Porodnicko-gynekologická klinika LF UP a FN, Olomouc, přednosta prof. MUDr. R. Pilka, Ph.D.

²Ústav lékařské genetiky LF UP a FN, Olomouc, přednosta prof. MUDr. M. Procházka, Ph.D.

³Transfuzní oddělení FN, Olomouc, vedoucí oddělení MUDr. D. Galuszková, Ph.D., MBA

⁴Ústav lékařské biofyziky LF UP, Olomouc, přednostka prof. RNDr. H. Kolářová, CSc.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effectiveness of the fetal *KEL* and *RHCE* genotype assessment in alloimmunized pregnant women by minisequencing.

Design: Prospective cohort study.

Setting: Obstetrics and Gynecology Clinic of the Faculty of Medicine UP and the University Hospital Olomouc; Institute of Medical Genetics of the Faculty of Medicine UP and the University Hospital Olomouc; Transfusion Department of the University Hospital Olomouc; Institute of Biophysics of the Faculty of Medicine UP Olomouc.

Subject and method: In the years 2001–2019, 366 samples of pregnant women in the first and second trimester were assessed *KEL* (n = 327) or *RHCE* (n = 39) genotype from the free fetal DNA circulating in the peripheral blood by minisequencing. The genotype of the fetus was verified from the buccal smear of the newborn.

Results: The *KEL* genotype was assessed in 327 women (the presence of a variant of the *KEL1* allele, which corresponds to the presence of the erythrocyte antigen "K". The analysis failed in 2 cases (2/327), 16 heterozygote women (*KEL1/KEL2*) were excluded and in the case of 309 homozygote women (*KEL2/KEL2*) the fetal *KEL* genotype was assessed.

In the case of 95.8% of the fetuses (296/309) and 95.5% of the newborns (295/309), the *KEL2/KEL2* genotype was assessed. In the case of 4.2% of the fetuses (13/309) and 4.5% of the newborns (14/309), the *KEL1/KEL2* genotype was assessed. The sensitivity was 92.86%. The specificity was 100%.

The *RHCE* genotype was assessed in 39 women. In the case of 22 women, the presence of a variant of the

RHCE gene, which corresponds to the presence of the erythrocyte antigen "C"/"c", was assessed. 5 heterozygote women (C/c) were excluded. In the case of 11 homozygote women (C/C), the *RHCE* genotype was assessed. In the case of 64% (7/11) of the fetuses and newborns, the C/c genotype was assessed, in the case of 36% (4/11) the C/C genotype was assessed.

In the case of 6 homozygote women (c/c), the *RHCE* genotype was assessed.

In the case of 67% (4/6) of the fetuses and newborns, the C/c genotype was assessed, in the case of 33% (2/6) the c/c genotype was assessed. The sensitivity and specificity were 100%.

In the case of 17 women, the presence of the variant of the *RHCE* gene, which corresponds to the presence of the erythrocyte antigen "E"/"e", was assessed. 1 heterozygote woman (E/e) was excluded. In the case of 16 homozygote women (e/e), the *RHCE* genotype was assessed. In the case of 75% (12/16) of the fetuses and newborns, the e/e genotype was assessed, in the case of 25% (4/16) the E/e genotype was assessed. The sensitivity and specificity were 100%.

Conclusion: The minisequencing method using the capillary electrophoresis enabled a reliable detection of the fetal *KEL* and *RHCE* genotype from the peripheral blood of pregnant women.

KEYWORDS

pregnancy, alloimmunization, cell free DNA, *KEL* and *RHCE* genotype

SOUHRN

Cíl studie: Zhodnotit efektivitu stanovení *KEL* a *RHCE* genotypu plodu u aloimunizovaných těhotných žen minisekvenací.

Typ studie: Prospektivní kohortová studie.

Název a sídlo pracoviště: Porodnicko-gynekologická klinika LF UP a FN Olomouc; Ústav lékařské genetiky LF UP a FN Olomouc; Transfuzní oddělení FN Olomouc; Ústav lékařské biofyziky LF UP Olomouc.

Materiál a metodika: V letech 2001–2019 byl celkem u 366 těhotných žen v prvním a druhém trimestru stanoven *KEL* (n = 327) nebo *RHCE* (n = 39) genotyp plodu z volné fetální DNA cirkulující v periferní krvi pomocí minisekvenace. Genotyp plodu byl ověřen bukalním stěrem u novorozence.

Výsledky: U 327 žen byl stanoven *KEL* genotyp (stanovení přítomnosti alely *KEL1*, která odpovídá přítomnosti erytrocytárního antigenu “K”), ve 2 případech analýza selhala (2/327), dále bylo vyloučeno 16 heterozygotních žen (*KEL1/KEL2*) a u 309 homozygotních žen (*KEL2/KEL2*) byl stanoven *KEL* genotyp u plodu. U 95,8 % plodů (296/309) a u 95,5 % novorozenců (295/309) byl stanoven genotyp *KEL2/KEL2* a u 4,2 % plodů (13/309) a u 4,5 % novorozenců (14/309) genotyp *KEL1/KEL2*. Senzitivita byla 92,86 % a specifita 100 %.

U 39 žen byl stanoven *RHCE* genotyp.

U 22 žen byla stanovena přítomnost varianty genu *RHCE*, která odpovídá přítomnosti erytrocytárního antigenu “C”/“c”. Bylo vyloučeno 5 heterozygotních žen (C/c).

U 11 homozygotních žen (C/C) byl stanoven *RHCE* genotyp u plodu. U 64 % (7/11) plodů i novorozenců byl stanoven genotyp C/c, u 36 % (4/11) genotyp C/C.

U 6 homozygotních žen (c/c) byl stanoven *RHCE* genotyp u plodu. U 67 % (4/6) plodů i novorozenců byl stanoven genotyp C/c, u 33 % (2/6) genotyp c/c. Senzitivita i specifita byla 100 %.

U 17 žen byla stanovena varianta genu *RHCE*, která odpovídá přítomnosti erytrocytárního antigenu “E”/“e”. Byla vyloučena jedna heterozygotní žena (E/e). U 16 homozygotních žen (e/e) byla stanoven *RHCE* genotyp u plodu. U 75 % (12/16) plodů i novorozenců byl stanoven genotyp e/e, u 25 % (4/16) genotyp E/e. Senzitivita i specifita byla 100 %.

Závěr: Minisekvenace s využitím kapilární elektroforézy umožnila spolehlivou detekci *KEL* a *RHCE* genotypu plodu z periferní krve těhotné ženy.

KLÍČOVÁ SLOVA

těhotenství, aloimunizace, volná fetální DNA, *KEL* a *RHCE* genotyp plodu

MUDr. Veronika Durdová, e-mail: VeronikaDurdova@seznam.cz
Čes. Gynek., 2020, 85, č. 3, s. 164–173

ÚVOD

V České republice (ČR) je u všech těhotných žen v I. trimestru prováděn screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek. Pozitivní výsledek screeningu je asi u 5 % žen (v ČR ročně 5000 žen), jen u cca 1,5 % (1500 žen) se jedná o klinicky významnou aloprotilátku.

Mezi klinicky významné antierytrocytární aloprotilátky patří i anti-K/k, anti C/c, anti-E/e. Je-li diagnostikována klinicky významná antierytrocytární aloprotilátka, jedná se o těhotenství s rizikem rozvoje hemolytické nemoci plodu a novorozence (HDFN, hemolytic disease of the fetus and newborn, hemolytická nemoc plodu a novorozence) [1].

Plod je však ohrožen rozvojem hemolytické nemoci pouze v případě, že má na povrchu svých erytrocytů přítomen komplementární antigen, jedná se přibližně o 0,5 % plodů (500 ročně). Přítomnost komplementárního antigenu lze vyšetřit neinvazivně stanovením genotypu plodu z volné fetální DNA cirkulující v periferní krvi těhotné ženy.

Závažná forma hemolytické nemoci plodu vyžadující podání intrauterinní transfuze do 35. týdne se však rozvine jen asi u 5–10 % z nich (25–50 plodů ročně). Rozvoj anémie u plodu lze diagnostikovat neinvazivně pomocí ultrazvukové dopplerometrie, stanovením maximální průtokové rychlosti v arteria cerebri media (MCA-PSV, Middle Cerebral Artery Peak Systolic Velocity). Kordocentéza by

měla být provedena pouze v indikovaných případech [14].

Cílem práce bylo zhodnotit efektivitu stanovení *KEL* a *RHCE* genotypu plodu u aloimunizovaných těhotných žen minisekvenací.

MATERIÁL A METODIKA

V letech 2001–2019 ve spolupráci Porodnicko-gynekologické kliniky, Ústavu lékařské genetiky a Transfuzního oddělení FNOL byl stanoven *KEL* genotyp plodu z volné fetální DNA cirkulující v periferní krvi u 327 těhotných žen (stanovení přítomnosti alely *KEL1*, která odpovídá přítomnosti

Tab. 1 Charakteristika sledovaného souboru těhotných žen. Celkem bylo vyšetřeno 366 těhotných žen, u 327 byl stanoven *KEL* genotyp plodu a u 39 *RHCE* genotyp plodu.

Těhotné ženy (n)	366	
	<i>KEL</i> 327	<i>RHCE</i> 39
Gestační stáří (týden)	7-30	
průměr	12,5	
medián	12	
věk (rok)	18-43	
průměr	30	
medián	30	
BMI (kg/m ²)	17-36	
průměr	24,3	
medián	23	
Rasa	kavkazská	

stanoven <i>KEL</i> genotyp u těhotných žen (n)	327
vyloučeny <i>KEL1</i> pozitivní (<i>K/k</i>) těhotné ženy (n)	16
vyloučeny <i>KEL1</i> pozitivní (<i>K/K</i>) těhotné ženy (n)	0
<i>KEL1</i> negativní (<i>k/k</i>) těhotné ženy (n)	311
selhala analýza volné fetální DNA (n)	2
stanovena přítomnost alely <i>KEL1</i> u plodu (n)	309

		genotyp novorozenec		celkem
		<i>K/k</i>	<i>k/k</i>	
genotyp	<i>K/k</i>	13	0	13
plod	<i>k/k</i>	1	295	296
celkem		14	295	309

Statistika	%	95% CI (%)
Senzitivita	92,86	66,13 - 99,82
Specifická	100,00	98,76 - 100,00
Falešná pozitivita	nelze hodnotit	nelze hodnotit
Falešná negativita	7,00	1 - 47
Prevalence onemocnění	4,53	2,5 - 7,49
Pozitivní prediktivní hodnota	100,00	nelze hodnotit
Negativní prediktivní hodnota	99,66	97,81 - 99,95
Přesnost	99,68	98,21 - 99,99

Schéma 1 Stanovení přítomnosti alely *KEL1* plodu u *KEL1* negativních žen – výsledky a parametry screeningového testu.

Stanovení přítomnosti alely *KEL1* plodu má klinický význam u aloimunizovaných žen s přítomnou aloprotilátkou anti-K. Aloprotilátka anti-K si může vytvořit pouze *KEL1* negativní žena (genotyp *k/k*) po kontaktu s *KEL1* pozitivními erytrocyty (krevní transfuze, fetomaternální hemoragie). Plod je však ohrožen rozvojem hemolytické nemoci pouze v případě, že má na povrchu svých erytrocytů přítomen komplementární antigen "K" (genotyp *K/k*).

Celkem bylo vyšetřeno 327 těhotných žen, *KEL* genotyp těhotné ženy byl stanoven z leukocytů v periferní žilní krvi a *KEL* genotyp plodu z volné fetální DNA v plazmě. *KEL* genotyp plodu byl následně ověřen stanovením *KEL* genotypu novorozenec z bukalního stěru. *KEL* genotyp ženy/plodu/novorozenec byl stanoven minisekvenací. Celkem se podařilo získat 309 „tripletů“ (*KEL* genotyp ženy/plodu/novorozenec).

CI (confidence interval) – interval spolehlivosti.

erytrocytárního antigenu "K") nebo RHCE genotyp plodu u 39 žen (stanovení přítomnosti varianty genu RHCE, která odpovídá přítomnosti erytrocytárního antigenu "C", "c", "E", "e").

Stanovení genotypu plodu bylo provedeno v 7. až 30. týdnu těhotenství (průměr 12,5; medián 12), věk těhotných žen byl 18–43 let (průměr 30,0, medián 30), BMI byl 17–36 (průměr: 24,3, medián: 23). Genotyp plodu byl ověřen bukalním stěrem u novorozence (tab. 1).

Pro stanovení *KEL* genotypu byla využita námi vyvinutá detailně popsaná a validovaná metodika pomocí minisekvenace [2]. Pro stanovení RHCE genotypu byla adaptována výše uvedená metodika.

K statistickému zpracování byl použit MedCalc Version 19.1.7 statistical package for biomedical research.

VÝSLEDKY

***KEL* genotyp** plodu byl stanoven u 327 žen, bylo vyloučeno 16 heterozygotních žen (*KEL1/KEL2*). Bylo vyšetřeno 311 homozygotních žen (*KEL2/KEL2*), ve dvou případech selhala analýza volné fetální DNA z důvodu nízké fetální frakce. U 309 homozygotních žen (*KEL2/KEL2*) byl stanoven genotyp plodu minisekvenací a následně ověřen stanovením genotypu u novorozenec. U 95,8 % plodů (296/309) a u 95,5 % novorozenců (295/309) byl stanoven genotyp *KEL2/KEL2* a u 4,2 % plodů (13/309) a u 4,5 % novorozenců (14/309) genotyp *KEL1/KEL2*. Senzitivita byla 92,9 % a specifická 100 % (schéma 1).

RHCE genotyp plodu byl stanoven u 39 žen.

U 22 žen bylo provedeno stanovení přítomnosti varianty genu RHCE, která odpovídá přítomnosti

stanoven <i>RHCE</i> genotyp u těhotných žen (n)	39
varianta genu <i>RHCE</i> odpovídající antigenu "C"/"c" (n)	22
vyloučeny c pozitivní (C/c) těhotné ženy (n)	5
vyloučeny c pozitivní (c/c) těhotné ženy (n)	6
c negativní (C/C) těhotné ženy (n)	11
selhala analýza volné fetální DNA (n)	0
stanovena varianta genu <i>RHCE</i> odpovídající antigenu "c" (n)	11

		genotyp novorozenec		celkem
		C/c	C/C	
genotyp plod	C/c	7	0	7
	C/C	0	4	4
celkem		7	4	11

Statistika	%	95% CI (%)
Senzitivita	100,00	59,04 - 100,00
Specifická	100,00	39,76 - 100,00
Falešná pozitivita	nelze hodnotit	nelze hodnotit
Falešná negativita	0,00	nelze hodnotit
Prevalence onemocnění	63,64	30,79 - 89,07
Pozitivní prediktivní hodnota	100,00	nelze hodnotit
Negativní prediktivní hodnota	100,00	nelze hodnotit
Přesnost	100,00	71,51- 100,00

Schéma 2 Stanovení přítomnosti varianty genu *RHCE*, která odpovídá přítomnosti erytrocytárního antigenu "c" u plodu u c negativních žen – výsledky a parametry screeningového testu.

Stanovení přítomnosti varianty genu *RHCE*, která odpovídá přítomnosti erytrocytárního antigenu "c" u plodu má klinický význam u aloimmunizovaných žen s přítomnou aloprotilátkou anti-c. Aloprotilátku anti-c si může vytvořit pouze c negativní žena (genotyp C/C) po kontaktu s c pozitivními erytrocyty (krevní transfuze, fetomaternální hemoragie). Plod je však ohrožen rozvojem hemolytické nemoci pouze v případě, že má na povrchu svých erytrocytů přítomen komplementární antigen "c" (genotyp C/c).

Celkem bylo vyšetřeno 39 těhotných žen, *RHCE* genotyp těhotné ženy byl stanoven z leukocytů v periferní žilní krvi a *RHCE* genotyp plodu z volné fetální DNA v plazmě. *RHCE* genotyp plodu byl následně ověřen stanovením *RHCE* genotypu novorozence z bukalního stěru. *RHCE* genotyp ženy/plodu/novorozence byl stanoven minisekvencí. Celkem se podařilo získat 33 „tripletů“ (*RHCE* genotyp ženy/plodu/novorozence).

CI (confidence interval) – interval spolehlivosti.

erytrocytárního antigenu "C"/"c". Bylo vyloučeno pět heterozygotních žen (C/c). U 11 homozygotních žen (C/C) byla stanovena přítomnost varianty genu *RHCE* plodu, která odpovídá přítomnosti erytrocytárního antigenu "c" minisekvencí a následně ověřena stanovením genotypu u novorozence. U 64 % (7/11) plodů i novorozenců byl stanoven genotyp C/c, u 36 % (4/11) genotyp C/C. U 6 homozygotních žen (c/c) byla stanovena přítomnost varianty genu *RHCE* plodu, která odpovídá přítomnosti erytrocytárního antigenu "C" minisekvencí a následně ověřena stanovením genotypu u novorozence. U 67 % (4/6) plodů i novorozenců byl stanoven genotyp C/c, u 33 % (2/6)

genotyp c/c. Senzitivita i specifická byla 100 % (Schéma 2 a 3).

U 17 žen bylo provedeno stanovení přítomnosti varianty genu *RHCE*, která odpovídá přítomnosti erytrocytárního antigenu "E"/"e". Byla vyloučena jedna heterozygotní žena (E/e). U 16 homozygotních žen (e/e) byla stanovena přítomnost varianty genu *RHCE* plodu, která odpovídá přítomnosti erytrocytárního antigenu "E"/"e" minisekvencí a následně ověřena stanovením genotypu u novorozence. U 75 % (12/16) plodů i novorozenců byl stanoven genotyp e/e, u 25 % (4/16) genotyp E/e. Senzitivita i specifická byla 100 % (schéma 4).

stanoven <i>RHCE</i> genotyp u těhotných žen (n)	39
varianta genu <i>RHCE</i> odpovídající antigenu "C"/"c" (n)	22
vyloučeny C pozitivní (C/c) těhotné ženy (n)	5
vyloučeny C pozitivní (C/C) těhotné ženy (n)	11
C negativní (c/c) těhotné ženy (n)	6
selhala analýza volné fetální DNA (n)	0
stanovena varianta genu <i>RHCE</i> odpovídající antigenu "C" (n)	6

		genotyp novorozenec		
		C/c	c/c	celkem
genotyp plod	C/c	4	0	4
	c/c	0	2	2
celkem		4	2	6

Statistika	%	95% CI (%)
Senzitivita	100,00	39,76 - 100,00
Specifická	100,00	15,81 - 100,00
Falešná pozitivita	nelze hodnotit	nelze hodnotit
Falešná negativita	0,00	nelze hodnotit
Prevalence onemocnění	66,67	22,58 - 95,67
Pozitivní prediktivní hodnota	100,00	nelze hodnotit
Negativní prediktivní hodnota	100,00	nelze hodnotit
Přesnost	100,00	54,07- 100,00

Schéma 3 Stanovení přítomnosti varianty genu *RHCE*, která odpovídá přítomnosti erytrocytárního antigenu "C" u plodu u C negativních žen – výsledky a parametry screeningového testu.

Stanovení přítomnosti varianty genu *RHCE*, která odpovídá přítomnosti erytrocytárního antigenu "C" u plodu má klinický význam u aloimunizovaných žen s přítomnou aloprotilátkou anti-C. Aloprotilátku anti-C si může vytvořit pouze C negativní žena (genotyp c/c) po kontaktu s C pozitivními erytrocyty (krevní transfuze, fetomaternální hemoragie). Plod je však ohrožen rozvojem hemolytické nemoci pouze v případě, že má na povrchu svých erytrocytů přítomen komplementární antigen "C" (genotyp C/C).

Celkem bylo vyšetřeno 39 těhotných žen, *RHCE* genotyp těhotné ženy byl stanoven z leukocytů v periferní žilní krvi a *RHCE* genotyp plodu z volné fetální DNA v plasmě. *RHCE* genotyp plodu byl následně ověřen stanovením *RHCE* genotypu novorozence z bukalního stěru. *RHCE* genotyp ženy/plodu/novorozence byl stanoven minisekvenací. Celkem se podařilo získat 33 „tripletů“ (*RHCE* genotyp ženy/plodu/novorozence).

CI (confidence interval) – interval spolehlivosti.

DISKUSE

Je-li u těhotné ženy zjištěna klinicky významná antierytrocytární aloprotilátka, je plod a novorozenec ohrožen rozvojem HDFN pouze v případě, že má na svých erytrocytech přítomen komplementární antigen [4]. Přítomnost komplementárního erytrocytárního antigenu lze zjistit neinvazivně z volné fetální DNA cirkulující v periferní krvi těhotné ženy. Výhodou je možnost vyloučit plody, které na svých erytrocytech přítomen antigen nemají. Naopak plody, které antigen přítomen mají (asi 500 ročně) lze sledovat neinvazivně pomocí ultrazvukové dopplerometrie, stanovením MCA-PSV. Kordocentéza

by měla být provedena pouze v indikovaných případech [14].

Mezi klinicky nejvýznamnější aloprotilátky patří i anti-E, anti-K, anti-C, anti-c, anti-e a anti-k; seřazeno podle incidence [11]. V České republice je u aloimunizovaných žen dostupné stanovení **RHD** a **RHCE** genotypu plodu pomocí Real time PCR [12]. Naším cílem bylo zhodnotit efektivitu stanovení **KEL a RHCE genotypu** plodu u žen **minisekvenací**.

Aloprotilátku anti-E si může vytvořit pouze "E" negativní žena (genotyp e/e) po kontaktu s "E" pozitivními erytrocyty (krevní transfuze, fetomaternální hemoragie). Může však vznikat i přirozeně

stanoven <i>RHCE</i> genotyp u těhotných žen (n)	39
stanovena varianta genu <i>RHCE</i> odpovídající antigenu "E"	17
vyločeny E pozitivní (E/e) těhotné ženy (n)	1
E negativní (e/e) těhotné ženy (n)	16
selhala analýza volné fetální DNA (n)	0
stanovena varianta genu <i>RHCE</i> odpovídající antigenu "E"	16

		genotyp novorozence		
		<i>E/e</i>	<i>e/e</i>	celkem
genotyp plod	<i>E/e</i>	4	0	4
	<i>e/e</i>	0	12	12
celkem		4	12	16

Statistika	%	95% CI (%)
Senzitivita	100,00	76,00 - 100,00
Specifická	100,00	54,00 - 100,00
Falešná pozitivita	nelze hodnotit	nelze hodnotit
Falešná negativita	0,00	nelze hodnotit
Prevalence onemocnění	25,00	27,00 - 52,38
Pozitivní prediktivní hodnota	100,00	nelze hodnotit
Negativní prediktivní hodnota	100,00	nelze hodnotit
Přesnost	100,00	41,00 - 100,00

Schéma 4 Stanovení přítomnosti varianty genu *RHCE*, která odpovídá přítomnosti erythrocytárního antigenu "E" u plodu u E negativních žen – výsledky a parametry screeningového testu.

Stanovení přítomnosti varianty genu *RHCE*, která odpovídá přítomnosti erythrocytárního antigenu "E" u plodu má klinický význam u aloimmunizovaných žen s přítomnou aloprotilátkou anti-E. Aloprotilátku anti-E si může vytvořit pouze E negativní žena (genotyp *e/e*) po kontaktu s E pozitivními erythrocyty (krevní transfuze, fetomaternální hemoragie). Plod je však ohrožen rozvojem hemolytické nemoci pouze v případě, že má na povrchu svých erythrocytů přítomen komplementární antigen "E" (genotyp *E/e*).

Celkem bylo vyšetřeno 39 těhotných žen, *RHCE* genotyp těhotné ženy byl stanoven z leukocytů v periferní žilní krvi a *RHCE* genotyp plodu z volné fetální DNA v plazmě. *RHCE* genotyp plodu byl následně ověřen stanovením *RHCE* genotypu novorozence z bukalního stěru. *RHCE* genotyp ženy/plodu/novorozence byl stanoven minisekvencí. Celkem se podařilo získat 33 „tripletů“ (*RHCE* genotyp ženy/plodu/novorozence).

CI (confidence interval) – interval spolehlivosti.

bez erythrocytárního antigenního podnětu; takto vzniklá protilátka není aloprotilátkou a je otázkou, zda vůbec může způsobit rozvoj HDFN [13]. Incidence aloprotilátky anti-E u těhotných žen je 5,7 % [11]. V ČR se jedná ročně přibližně o 600 žen. Jedná se o nejčastěji diagnostikovanou aloprotilátku [17, 18, 20]. Incidence antigenu "E" je u bělošské populace asi 30 % [10, 15]. "E" negativní žena (genotyp *e/e* – 70 %) má proto 30% pravděpodobnost, že její partner bude "E" pozitivní (genotyp *E/e* – 28 %, *E/E* – 2 %) a tudíž má 16% pravděpodobnost, že bude mít "E" pozitivní plod (genotyp *E/e*). Můžeme tedy předpokládat asi 96 ohrožených plodů ročně. Stanovením *RHCE* genotypu plodu, dokážeme vyloučit až 84 % plodů (504 plodů ročně), u kterých

není přítomna varianta genu *RHCE*, která odpovídá přítomnosti antigenu "E" [13] (obr. 1). V našem souboru bylo 25 % (4/16) "E" pozitivních plodů (genotyp *E/e*) a 75 % (12/16) "E" negativních (genotyp *e/e*). Výsledky korespondují s publikovanými daty, jsou však ovlivněny malým počtem vzorků.

Aloprotilátku anti-K si může vytvořit pouze "K" negativní žena (genotyp *k/k*) po kontaktu s "K" pozitivními erythrocyty (krevní transfuze, fetomaternální hemoragie) [8]. Aloprotilátka anti-K může způsobovat závažnou formu HDFN [16]. Závažnost HDFN lze jen obtížně předpovědět, protože korelace mezi hladinou aloprotilátky a stupněm fetální anémie je jen velmi malá [21]. Kromě hemolýzy inkompatibilních erythrocytů může způsobovat

Rh systém (ISBT 004)

systém Rh je tvořen více než 50 antigeny
k nejvýznamnějším antigenům Rh systému patří:

"E"
"e", "E", "E"

fenotyp		genotyp		aloprotilátka	
antigen	%	alely	%	anti-e	anti-E
"e"	70	e/e	70		ANO
"e"+"E"	30	e/E	28		
"E"		E/E	2	ANO	

na povrchu erytrocytů jsou přítomny antigeny "e" a/nebo "E"
alely e a E jsou kodominantní

Aloprotilátku anti-e si může vytvořit pouze Rhe negativní žena po kontaktu s Rhe pozitivními erythrocyty (krevní transfúze, fetomater-
nální hemoragie), plod může být mateřskou aloprotilátkou ohrožen
hemolytickou nemocí, pokud je Rhe pozitivní (incidence **Rhe pozitiv-
ních plodů** u Rhe negativních žen je **1,7 %**).

Aloprotilátku anti-E si může vytvořit pouze RhE negativní žena po
kontaktu s RhE pozitivními erythrocyty (krevní transfúze, fetomater-
nální hemoragie), plod může být mateřskou aloprotilátkou ohrožen
hemolytickou nemocí, pokud je RhE pozitivní (incidence **RhE pozi-
tivních plodů** u RhE negativních žen je **11,2 %**).

management těhotenství s diagnostikovanou aloimunizací těhotné ženy erythrocytárním antigenem "e"

(přítomny aloprotilátky anti-e)

incidence aloprotilátky anti-e u těhotných žen

0,0 %

cca **20** těhotných žen ročně v České republice

pravděpodobnost přítomnosti antigenu "e" u plodu

84 %

16 % cca **3** plody nejsou ohroženy hemolytickou nemocí

management těhotenství s diagnostikovanou aloimunizací těhotné ženy erythrocytárním antigenem "E"

(přítomny aloprotilátky anti-E)

incidence aloprotilátky anti-E u těhotných žen

0,6 %

cca **600** těhotných žen ročně v České republice

pravděpodobnost přítomnosti antigenu "E" u plodu

16 %

84 % cca **504** plodů není ohroženo hemolytickou nemocí

Obr. 1 Klinický význam stanovení varianty genu RHCE, která odpovídá přítomnosti erythrocytárního antigenu "E"/ "e" u plodu

V České republice je u všech těhotných žen v I. trimestru prováděn screening nepravidelných antierythrocytárních protilátek. Klinicky významná aloprotilátka anti-E je diagnostikována nejčastěji, asi u 0,6 % žen (v ČR ročně 600 žen). Navíc přibližně 84 % plodů (504 plody ročně) nemá přítomen komplementární antigen, a tudíž nejsou ohroženy rozvojem HDFN. Přítomnost komplementárního antigenu lze vyšetřit neinvazivně stanovením RHCE genotypu plodu z volné fetální DNA cirkulující v periferní krvi těhotné ženy. Naproti tomu klinicky významná aloprotilátka anti-e je diagnostikována jen u přibližně 0,02 % žen (v ČR ročně 20 žen) a komplementární antigen je přítomen u většiny plodů, asi u 84 % plodů (17 plodů ročně). Vyšetření přítomnosti komplementárního antigenu neinvazivně stanovením RHCE genotypu plodu tudíž nemá klinický význam v managementu těhotenství s rizikem rozvoje HDFN (hemolytic disease of the fetus and newborn – hemolytická nemoc plodu a novorozence).

Upraveno podle Holusková I. [11], Kratochvílová T. [13] a Reid M. [19]

i útlum krvetvorby jejich prekurzorů v kostní dřeni [5, 6, 7]. Incidence aloprotilátky anti-K u těhotných žen je asi 1,2 % [11]. V ČR se jedná ročně přibližně o 100 žen. Incidence antigenu "K" je u bělošské populace asi 10 % [15]. "K" negativní žena (genotyp KEL2/KEL2 – 90 %), má proto 10% pravděpodobnost, že její partner bude "K" pozitivní (většinou heterozygot na lokusu K, genotyp KEL1/KEL2), a tudíž má 5% pravděpodobnost, že bude mít "K" pozitivní plod (genotyp KEL1/KEL2). Můžeme tedy předpokládat asi pět ohrožených plodů ročně. Stanovením KEL genotypu plodu, dokážeme vyloučit až 95 % plodů (95 plodů ročně), u kterých není přítomna alela KEL1 odpovídající přítomnosti erythrocytárního antigenu "K" [8] (obr. 2). V našem souboru bylo 95,5 % (295/309) "K" negativních plodů (genotyp KEL2/KEL2) a 4,5 % (14/309) "K" pozitivních (genotyp KEL1/KEL2). Výsledky korespondují s publikovanými daty.

Aloprotilátku anti-C si může vytvořit pouze "C" negativní žena (genotyp c/c) po kontaktu s "C" pozitivními erythrocyty (krevní transfúze, fetomater-
nální hemoragie) [13]. Incidence aloprotilátky anti-C u těhotných žen je 1,2 % [11, 19]. V ČR se

jedná ročně asi o 100 žen. Incidence antigenu "C" je u bělošské populace přibližně 68 % [15]. "C" negativní žena (genotyp c/c – 32 %) má proto 68% pravděpodobnost, že její partner bude "C" pozitivní (genotyp C/c – 48 %, C/C – 20 %) a tudíž má 44% pravděpodobnost, že bude mít "C" pozitivní plod (genotyp C/c). Můžeme tedy předpokládat asi 44 ohrožených plodů ročně. Stanovením RHCE genotypu plodu, dokážeme vyloučit až 65 % plodů (56 plodů ročně), u kterých není přítomna varianta genu RHCE, která odpovídá přítomnosti antigenu "C" [13] (obr. 3).

V našem souboru bylo 66,7 % (4/6) "C" pozitivních plodů (genotyp C/c) a 33,3 % (2/6) "C" negativních (genotyp c/c). Výsledky nekorespondují s publikovanými daty, jsou však ovlivněny velmi malým počtem vzorků.

Aloprotilátku anti-c si může vytvořit pouze "c" negativní žena (genotyp C/C) po kontaktu s "c" pozitivními erythrocyty (krevní transfúze, fetomater-
nální hemoragie) [13]. Jde o klinicky významnou aloprotilátku, která je schopna způsobit závažnou formu HDFN. Velmi často jde o opožděnou hemolýzu. Její hemolytický potenciál je velmi podobný

KELL systém (ISBT 006)
systém KELL je tvořen 27 antigeny
každý z nich je označen jménem, písmennou zkratkou a číslem
"Kell", "K", "KEL1"
"Cellano", "k", "KEL2"

fenotyp		genotyp		aloproti látka	
antigen	%	alely	%	anti-K	anti-k
"K"	10	K/K	0,2		ANO
"K" + "k"		K/k	9,8		
"k"	90	k/k	90,0	ANO	

na povrchu erytrocytů jsou přítomny antigeny "K" a/nebo "k"
alely K a k jsou konkomitantní

Aloprotilátku anti-K si může vytvořit pouze Kell (K) negativní žena po kontaktu s Kell (K) pozitivními erytrocyty (krevní transfúze, fetomaternální hemoragie); plod může být mateřskou aloprotilátkou ohrožen hemolytickou nemocí, pokud je Kell (K) pozitivní (incidence **Kell (K) pozitivních plodů** u Kell (K) negativních žen jen **4,59 %**).

Aloprotilátku anti-k si může vytvořit pouze Cellano (k) negativní žena po kontaktu s Cellano (k) pozitivními erytrocyty (krevní transfúze, fetomaternální hemoragie); plod může být mateřskou aloprotilátkou ohrožen hemolytickou nemocí, pokud je Cellano (k) pozitivní (incidence **Cellano (k) pozitivních plodů** u Cellano (k) negativních žen jen **0,19 %**).

management těhotenství s diagnostikovanou aloimunizací těhotné ženy erytrocytárním antigenem "K"

(přítomny aloprotilátky anti-K)

incidence aloprotilátky anti-K u těhotných žen

0,1 %

cca 100 těhotných žen ročně v České republice

pravděpodobnost přítomnosti antigenu "K" u plodu

5,1 %

94,9 % cca 95 plodů není ohroženo hemolytickou nemocí

management těhotenství s diagnostikovanou aloimunizací těhotné ženy s erytrocytárním antigenem "k"

(přítomny aloprotilátky anti-k)

incidence aloprotilátky anti-k u těhotných žen

0,0 %

cca 10 těhotných žen ročně v České republice

pravděpodobnost přítomnosti antigenu "k" u plodu

94,9 %

5,1 % cca 1 plod není ohroženo hemolytickou nemocí

Obr. 2 Klinický význam stanovení KEL genotypu plodu u aloimunizovaných žen

V České republice je u všech těhotných žen prováděn screening nepravidelných antierytrocytárních aloprotilátek. Klinicky významná aloprotilátka anti-K je diagnostikována asi u 0,1 % žen (v ČR ročně asi 100 žen). Plod je však ohrožen rozvojem HDFN pouze v případě, že má na povrchu erytrocytů přítomen komplementární antigen, jedná se asi o 5 % plodů (5 plodů ročně), naopak 95 % plodů (95 plodů ročně) komplementární antigen přítomen nemá, a tudíž nejsou ohroženy rozvojem HDFN. Přítomnost komplementárního antigenu lze vyšetřit neinvazivně stanovením KEL genotypu plodu pomocí minisekvence.

Naproti tomu klinicky významná aloprotilátka anti-k je diagnostikována jen asi u 0,01 % žen (v ČR ročně 10 žen) a komplementární antigen je přítomen u většiny plodů, u přibližně 95 % plodů (9 plodů ročně). Vyšetření přítomnosti komplementárního antigenu neinvazivně stanovením KEL genotypu plodu tudíž nemá klinický význam v managementu těhotenství s rizikem rozvoje HDFN (hemolytic disease of the fetus and newborn – hemolytická nemoc plodu a novorozence).

Upraveno podle Holusková I. [11], Durdová V. [8] a McKenna D. S. [16].

aloproti látce anti-D [9, 22]. Incidence aloprotilátky anti-c u těhotných žen je 0,8–1,0 ‰ [11, 19]. V ČR ročně se jedná asi o 100 žen. Incidence antigenu "c" je u bělošské populace přibližně 80 % [15], "c" negativní žena (genotyp C/C – 20 %) má proto 80 % pravděpodobnost, že její partner bude "c" pozitivní (genotyp c/C – 48 %, c/c – 32 %) a tudíž má 56 % pravděpodobnost, že bude mít "c" pozitivní plod (genotyp c/C, c/c). Můžeme tedy předpokládat asi 56 ohrožených plodů ročně. Stanovením RHCE genotypu plodu, dokážeme vyloučit až 44 % plodů (44 plodů ročně), u kterých není přítomna varianta genu RHCE, která odpovídá přítomnosti antigenu "c" [13] (obr. 3). V našem souboru bylo 63,6 % (7/11) "c" pozitivních plodů (genotyp c/C) a 36,3 % (4/11) "c" negativních (genotyp C/C). Výsledky korespondují s publikovanými daty.

Aloprotilátku anti-e si může vytvořit pouze "e" negativní žena (genotyp E/E) po kontaktu s "e" pozitivními erytrocyty (krevní transfúze, fetomaternální hemoragie) [13]. Incidence aloprotilátky anti-e u těhotných žen je asi 0,2 ‰ [11, 19]. V ČR se jedná ročně o přibližně 20 žen. Komplementární

antigen je přítomen u většiny plodů, u 84 % plodů (17 plodů ročně). Vyšetření přítomnosti komplementárního antigenu neinvazivním stanovením RHCE genotypu plodu tudíž nemá klinický význam v managementu těhotenství s rizikem rozvoje HDFN (obr. 1).

Aloprotilátku anti-k si může vytvořit pouze "k" negativní žena (genotyp K/K) po kontaktu s "k" pozitivními erytrocyty (krevní transfúze, fetomaternální hemoragie). Incidence aloprotilátky anti-k (Cellano, KEL2) u těhotných žen je asi 0,1 ‰ [11, 19]. V ČR se jedná ročně asi o 10 žen. Komplementární antigen je přítomen u většiny plodů, u 95 % plodů (9 plodů ročně). Vyšetření přítomnosti komplementárního antigenu neinvazivním stanovením KEL genotypu plodu tudíž nemá klinický význam v managementu těhotenství s rizikem rozvoje HDFN [3] (obr. 2).

ZÁVĚR

Minisekvence s využitím kapilární elektroforézy umožnila spolehlivou detekci KEL a RHCE

Rh systém (ISBT 004)

systém Rh je tvořen více než 50 antigeny
k nejvýznamnějším antigenům Rh systému patří:

"D"
"c", "C", "e", "E"

fenotyp		genotyp		aloprotilátka	
antigen	%	alely	%	anti-c	anti-C
"c"	80	c/c	32		ANO
"c" + "C"		C/C	48		
"C"	20	C/C	20	ANO	

na povrchu erytrocytů jsou přítomny antigeny "c" nebo "C"
alely c a C jsou kodominantní

Aloprotilátku anti-c si může vytvořit pouze Rhc negativní žena po kontaktu s Rhc pozitivními erytrocyty (krevní transfúze, fetomater-
nální hemoragie), plod může být mateřskou aloprotilátkou ohrožen
hemolytickou nemocí, pokud je Rhc pozitivní (incidence **Rhc pozitiv-
ních plodů** u Rhc negativních žen je **11,2 %**).

Aloprotilátku anti-C si může vytvořit pouze RhC negativní žena po
kontaktu s RhC pozitivními erytrocyty (krevní transfúze, fetomater-
nální hemoragie), plod může být mateřskou aloprotilátkou ohrožen
hemolytickou nemocí, pokud je RhC pozitivní (incidence **RhC pozitiv-
ních plodů** u RhC negativních žen je **14,1 %**).

management těhotenství s diagnostikovanou aloimunizací těhotné ženy erytrocytárním antigenem "c"

(přítomny aloprotilátky anti-c)

incidence aloprotilátky anti-c u těhotných žen
pravděpodobnost přítomnosti antigenu "c" u plodu

0,1 %
56 %

cca **100** těhotných žen ročně v České republice
44 % cca **44** plodů není ohroženo hemolytickou nemocí

management těhotenství s diagnostikovanou aloimunizací těhotné ženy erytrocytárním antigenem "C"

(přítomny aloprotilátky anti-C)

incidence aloprotilátky anti-C u těhotných žen
pravděpodobnost přítomnosti antigenu "C" u plodu

0,1 %
44 %

cca **100** těhotných žen ročně v České republice
56 % cca **56** plodů není ohroženo hemolytickou nemocí

Obr. 3 Klinický význam stanovení varianty genu *RHCE*, která odpovídá přítomnosti erytrocytárního antigenu "C"/"c" u plodu
V České republice je u všech těhotných žen v I. trimestru prováděn screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek. Klinicky
významná aloprotilátka anti-C je diagnostikována asi u 0,1 % žen (v ČR ročně 100 žen), asi 56 % plodů (56 plodů ročně) však nemá přítomen
komplementární antigen, a tudíž není ohroženo rozvojem HDFN. Rovněž klinicky významná aloprotilátka anti-c je diagnostikována
u přibližně 0,1 % žen (v ČR ročně 100 žen) a asi 44 % plodů (44 plodů ročně) nemá přítomen komplementární antigen. Přítomnost
komplementárního antigenu lze vyšetřit neinvazivně stanovením *RHCE* genotypu plodu z volné fetální DNA cirkulující v periferní krvi
těhotné ženy.

HDFN (hemolytic disease of the fetus and newborn – hemolytická nemoc plodu a novorozence).

Upraveno podle Holusková I. [11], Kratochvílová T. [13] a Reid M. [19]

genotypu plodu z periferní krve těhotné ženy.
Klinický význam má stanovení genotypu plodu
u aloimunizovaných žen s přítomnou antierytrocy-
tární aloprotilátkou anti-E, anti-K, anti-C a anti-c.

Podpořeno grantem IGA MZ ČR NT-12225-4/2011.
Podpořeno MZ ČR – RVO (FNO1, 00098892).

LITERATURA

1. Basu, S., Kaur, R., Kaur, G. Hemolytic disease of the fetus and newborn: Current trends and perspectives. *Asian J Transfusion Sci*, 2011, 5, p. 3–7.
2. Bohmova, J., Vodicka, R., Lubusky, M., et al. Clinical potential of effective noninvasive exclusion of KEL1-positive fetuses in KEL1-negative pregnant women. *Fetal Diag Ther*, 2016, 40, p. 48–53.
3. Bowman, JM., Harman, CR., Manning, FA., Pollock, JM. Erythroblastosis fetalis produced by anti-k. *Vox Sang*, 1989, 56, 3, p. 187–189, Erratum in: *Vo. Sang*, 1990, 58, 2, p. 139.
4. British Committee for Standards in Haematology. **Milkins, C., Berryman, J., et al.** Guidelines for pre-transfusi-

on compatibility procedures in blood transfusion laboratories. British Committee for Standards in Haematology. *Transfus Med*, 2013, 23, p. 3–35.

5. Daniels, G., Bromilow, I. *Essential Guide to Blood Groups*. 1th ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2007.
6. Daniels, G., Green, C. Expression of red cell surface antigens during erythropoiesis. *Vox Sang*, 2000, 78 (Suppl. 2), p. 149–153.
7. Daniels, G., Hadley, A., Green, C. Fetal anemia due to anti-K may result from immune destruction of early erythroid progenitors. *Transfus Med*, 1999, 9 (suppl. 1), p. 16 (abstract).
8. Durdová, V., Holusková, I., Kratochvílová, T., et al. Klinický význam neinvazivního stanovení *KEL* genotypu plodu v managementu těhotenství s rizikem rozvoje hemolytické nemoci plodu a novorozence. *Postgrad Med*, 2016, 18, s. 358–361.
9. Hackney, DN., Knudtson, EJ., Rossi, KQ., et al. Management of pregnancies complicated by anti-c isoimmunization. *Obstet Gynecol*, 2004, 103, p. 24–30.
10. Holuskova, I., Lubusky, M., Studnickova, M., et al. Erytrocytární aloimunizace u těhotných žen, klinický význam a laboratorní diagnostika. *Ces Gynek*, 2013, 78, s. 89–99.
11. Holuskova, I., Lubusky, M., Studnickova, M., et al. Incidence of erythrocyte alloimmunization in pregnant women in olomouc region. *Ces Gynek*, 2013, 78, s. 56–61.

12. **Hromadnikova, I., Vechetova, L., Vesela, K., et al.** Non-invasive fetal *RHD* and *RHCE* genotyping using real-time PCR testing of maternal plasma in Rh-negative pregnancies. *J Histochemistry Cytochemistry*, 2005, 53, p. 1-5.
13. **Kratochvilova, T., Durdova, V., Strasilova, P., et al.** Klinický význam neinvazivního stanovení *RHD* a *RHCE* genotypu plodu v managementu těhotenství s rizikem rozvoje hemolytické nemoci plodu a novorozence. *Postgrad Med*, 2016, 18, s. 362-369.
14. **Lubušký, M., Procházka, M., Hálek, J., Klásková, E.** Management těhotenství s rizikem rozvoje hemolytické nemoci plodu a novorozence. *Postgrad Med*, 2016, 18, s. 352-357.
15. **Masopust, J., Písačka, M.** Praktická imunohematologie. *Erythrocyty*. Praha: Mladá fronta, 2016, 1. vyd.
16. **McKenna, DS., Nagaraja, HN., O'Shaughnessy, RW.** Management of pregnancies complicated by anti-Kell isoimmunization. *Obstet Gynecol*, 1999, 93, p. 667-673.
17. **Moinuddin, I., Fletcher, C., Millward, P.** Prevalence and specificity of clinically significant red cell alloantibodies in pregnant women - a study from a tertiary care hospital in Southeast Michigan. *Journal of blood medicine* 2019, 10, p. 283-289
18. **Pal, M., Williams, B.** Prevalence of maternal red cell alloimmunisation: a population study from Queensland, Australia. *Pathology*, 2015, 47, p. 151-155.
19. **Reid, M., Lomas-Francis, C.** The blood group antigen facts. 2nd ed, New York: Elsevier Academic Press, 2004.
20. **Smith, HM., Shirey, RS., Thoman, SK., et al.** Prevalence of clinically significant red blood cell alloantibodies in pregnant women at a large tertiary-care facility. *Immunohematology*, 2013, 29, p. 127-130.
21. **van Wamelen, DJ., Klumper, FJ., de Hass, M., et al.** Obstetric history and antibody titer in estimating severity of Kell alloimmunization in pregnancy. *Obstet Gynecol*, 2007, 109, p. 1093-1098.
22. **Wenk, RE., Goldstein, P., Felix, JK.** Alloimmunization by hr'(c), hemolytic disease of newborns, and perinatal management. *Obstet Gynecol*, 1986, 67, p. 623-626.

MUDr. Veronika Durdová
Porodnicko gynekologická klinika
LF UP a FN Olomouc,
I. P. Pavlova 6, 775 20, Olomouc
e-mail: VeronikaDurdova@seznam.cz