



Lékařská
fakulta

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

Disertační práce

MUDr. Veronika Durdová

Školitel: prof. MUDr. Marek Lubušký, Ph.D., MHA

Olomouc 2020

OBSAH

1	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	4
2	PODĚKOVÁNÍ	5
3	ÚVOD	6
4	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	7
4.1	ERYTROCYTÁRNÍ ALOIMUNIZACE	7
4.2	HEMOLYTICKÁ NEMOC PLODU A NOVOROZENCE	8
4.2.1	<i>Patofyziologie HDFN.....</i>	<i>13</i>
4.2.2	<i>Management u novorozence s HDFN.....</i>	<i>15</i>
4.3	MANAGEMENT TĚHOTENSTVÍ S RIZIKEM ROZVOJE HDFN.....	16
4.3.1	<i>Screening nepravidelných antierytrocytárních aloprotilátek</i>	<i>19</i>
4.3.2	<i>Neinvazivní stanovení genotypu plodu z periferní krve těhotné ženy</i>	<i>24</i>
4.3.3	<i>Sledování rozvoje anémie u plodu pomocí ultrazvukové dopplerometrie</i>	<i>25</i>
4.4	KLINICKÝ VÝZNAM STANOVENÍ KEL A RHCE GENOTYPU PLODU U ALOIMUNIZOVANÝCH TĚHOTNÝCH ŽEN.....	29
4.4.1	<i>Rh systém (ISBT 004)</i>	<i>31</i>
4.4.2	<i>Kell systém (ISBT 006).....</i>	<i>39</i>
5	CÍLE PRÁCE	44
6	SOUBOR A METODIKA.....	45
6.1	ODBĚR VZORKU A LABORATORNÍ ZPRACOVÁNÍ	47
6.2	STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ	47
6.3	STANOVENÍ KEL GENOTYPU PLODU	48
6.3.1	<i>Minisekvence s využitím kapilární elektroforézy</i>	<i>48</i>
6.4	STANOVENÍ RHCE GENOTYPU PLODU	50
6.4.1	<i>Minisekvence s využitím kapilární elektroforézy</i>	<i>50</i>
7	VÝSLEDKY	51
8	DISKUSE	56
9	ZÁVĚR	59
	LITERATURA (CITACE UVEDENY DLE NORMY ČSN ISO 690).....	60
10	VĚDECKO – VÝZKUMNÁ ČINNOST AUTORA.....	68
10.1	PRÁCE SOUVISEJÍCÍ S DISERTAČNÍ PRACÍ	68
10.1.1	<i>Původní vědecké publikace v daném oboru v časopise s IF</i>	<i>68</i>
10.1.2	<i>Původní vědecké publikace uvěřené v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech</i>	<i>68</i>

10.1.3	<i>Přehledné/souborné vědecké práce uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech</i>	68
10.1.4	<i>Publikovaná abstrakta</i>	69
10.1.5	<i>Seznam přednášek/posterů přednesených uchazečem na veřejných odborných fórech</i>	72
10.2	OSTATNÍ PUBLIKACE	73
10.2.1	<i>Původní vědecké publikace v daném oboru v časopise s IF</i>	73
10.2.2	<i>Přehledné/souborné vědecké práce uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech</i>	73
10.2.3	<i>Publikovaná abstrakta</i>	74
10.2.4	<i>Seznam přednášek/posterů přednesených uchazečem na veřejných odborných fórech</i>	79
11	GRANTY	80
12	SOUHRN	81
13	SUMMARY	83
14	PŘÍLOHY	85

1 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AGH	Antihuman globulin
CI	Confidence interval Interval spolehlivosti
ČGPS	Česká gynekologická a porodnická společnost
ČLS JEP	Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně
ČR	Česká republika
DNA	Deoxyribonucleic acid Deoxyribonukleová kyselina
FcRn	The neonatal Fc receptor
FMH	Fetomaternální hemoragie
HDFN	Hemolytic disease of the fetus and newborn Hemolytická nemoc plodu a novorozence
HON	Hemolytic disease of the newborn Hemolytická nemoc plodu
IgG	Imunoglobulin G
ISBT	International Society of Blood Transfusion
LISS	Low ionic strength solution Roztok o nízké iontové síle
MCA-PSV	Middle cerebral artery peak systolic velocity Maximální průtoková rychlost v arteria cerebri media
NAT	Nepřímý antiglobulinový test
PAT	Přímý antiglobulinový test
PCR	Polymerase chain reaction Polymerázová řetězová reakce
RBC	Red blood cell
Rh	Rhesus
RhAg	Rh associated glycoprotein
SBE	Single base extension

2 PODĚKOVÁNÍ

Děkuji svému školiteli prof. MUDr. Markovi Ľubuškému, Ph.D., MHA za odborné vedení a cenné rady a prof. MUDr. Radovanovi Pilkovi, Ph.D. za umožnění vědecké práce na Porodnicko – gynekologické klinice Fakultní nemocnice Olomouc.

Prohlašuji, že jsem disertační práci napsala samostatně s využitím pouze uvedených a řádně citovaných pramenů a literatury a že práce nebyla využita v rámci jiného vysokoškolského studia či k získání jiného nebo stejného titulu.

V Olomouci dne 14. 5. 2020

.....

3 ÚVOD

V České republice (ČR) je u všech těhotných žen v I. trimestru prováděn screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek. Pozitivní výsledek screeningu je u cca **5 %** žen (v ČR ročně **5.000** žen), jen u cca **1,5 %** (**1.500** žen) se jedná o klinicky významnou aloprotilátku.

Mezi klinicky významné antierytrocytární aloprotilátky patří **anti-D, 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.

Plod je však ohrožen rozvojem hemolytické nemoci pouze v případě, že má na povrchu svých erytrocytů přítomen komplementární antigen, jedná se o cca **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 u cca 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 [52].

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

4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

4.1 Erytrocytární aloimunizace

Erytrocytární aloimunizace se rozvíjí stimulací imunitního systému cizími povrchovými erytrocytárními antigeny, které následně navodí tvorbu imunních protilátek IgG [15]. Tyto protilátky vznikají, jestliže se žena potká s antigenem, který sama nevlastní (fetomaternální hemoragie, krevní transfúze). Při porušení fyziologické bariéry mezi fetální a mateřskou cirkulací mohou pronikat krvinky plodu do oběhu matky - **fetomaternální hemoragie**. Klinicky nejvýznamnější událostí, při které nejčastěji dochází k fetomaternální hemoragii je porod. Při inkompatibilitě erytrocytárních antigenů mezi matkou a plodem nebo po podání inkompatibilní krevní transfúze může dojít k rozvoji **aloimunizace** matky a mateřské aloprotilátky mohou v průběhu těhotenství pronikat placentou do krevního oběhu plodu, kde se v případě **přítomnosti komplementárního erytrocytárního antigenu** mohou navázat na fetální erytrocyty a ty jsou následně destruovány v retikuloendoteliálním systému plodu. Dochází k rozvoji hemolytické nemoci plodu a novorozence (Hemolytic disease of the fetus and newborn – HDFN) [3, 49, 50, 93].

4.2 Hemolytická nemoc plodu a novorozence

Hemolytická nemoc plodu a novorozence (Hemolytic disease of the fetus and newborn – HDFN) je způsobena rozpadem červených krvinek plodu nebo novorozence mateřskými protilátkami třídy IgG [16].

ALOIMUNNÍ HDFN

způsobena inkompatibilitou převážně v Rh, Kell systému (méně v ABO, Duffy, MNS, P a Diego systém).

Inkompatibilita v ABO systému - Lidé mají v systému ABO čtyři hlavní krevní skupiny (A, B, AB a O). Ve věku tří až šesti měsíců po porodu se začínají vytvářet protilátky proti “A“ a “B“ antigenům (vyskytující se všudypřítomně v potravinách a bakteriích). V důsledku toho může nastat hemolytická nemoc plodu a novorozence v souvislosti s ABO inkompatibilitou již v prvním těhotenství a vyskytuje se téměř výhradně u matek s krevní skupinou O [72]. Hemolytická nemoc plodu je při inkompatibilitě v ABO systému velmi raritní a novorozenci jsou při narození obvykle asymptomatictí a nemají žádnou nebo mírnou anémii. Hyperbilirubinémie se obvykle vyvíjí během prvních 24 hodin po narození. Fototerapie je obvykle dostačující pro většinu novorozenců s inkompatibilitou v ABO systému [81]. Méně než 0,1% novorozenců vyžaduje provedení výměnné transfúze [90].

Inkompatibilita v Rh systému - K nejvýznamnějším antigenům Rh systému, kterých je identifikovaných více než 50 [86], patří antigeny “D“, “C“, “c“, “E“, “e“. K tvorbě protilátek proti antigenům Rh systému dochází vždy až po stimulaci imunitního systému antigeně inkompatibilními erytrocyty po podání krevní transfúze nebo následkem fetomaternální hemoragie v souvislosti s těhotenství [36]. Výjimkou je aloprotilátka anti-E, ta může však vznikat i přirozeně bez erytrocytárního antigenního podnětu, takto vzniklá protilátka není aloprotilátkou a je otázkou, zda vůbec může způsobit rozvoj HDFN [43]. Forma HDFN se pohybuje od mírné do závažné formy anémie, která může vést k hydropsu až úmrtí plodu. Hyperbilirubinémie se obvykle vyskytuje během prvních 24 hodin života.

V současné době je všem RhD negativním těhotným ženám preventivně podán imunoglobulin IgG anti-D v případech potenciálně senzibilizujících událostí, při kterých může dojít k

průniku RhD pozitivních erytrocytů plodu do krve matky a rozvoji RhD aloimunizace, dále se provádí **antepartální profylaxe ve 28. týdnu** a po **porodu RhD pozitivního plodu**.

Události, při kterých by měl být podán imunoglobulin IgG anti-D RhD negativním ženám, nejsou-li u nich již přítomny aloprotilátky anti-D

I. trimestr (postačující dávka IgG anti-D 50 µg) - umělé ukončení těhotenství, samovolný potrat s instrumentální revizí dutiny děložní, operace mimoděložního těhotenství, biopsie choria, evakuace molární gravidity

II. a III trimestr (postačující dávka IgG anti-D 100 µg) - amniocentéza, kordocentéza, jiné invazivní výkony prenatalní diagnostiky a fetální terapie, indukovaný abort, intrauterinní úmrtí plodu, pokus o zevní obrat konce pánevního, břišní poranění, porodnické krvácení
antepartální profylaxe ve 28. týdnu - (postačující dávka IgG anti-D 250 µg)
porod RhD pozitivního plodu - (postačující dávka IgG anti-D 100 µg)

Stanovení objemu FMH (fetomaternální hemoragie) - je-li stanoven objem fetálních erytrocytů (red blood cells, RBCs) proniklých do oběhu matky, je indikováno podání IgG anti-D intramuskulárně v dávce 10 µg na 0,5 ml fetálních RBCs nebo 1 ml plné fetální krve. IgG anti-D v dávce 10 µg podané nitrosvalově by mělo pokrýt 0,5 ml fetálních RhD pozitivních RBCs nebo 1 ml plné fetální krve. FMH je objem fetálních RBCs, objem fetální krve je dvojnásobný (předpokládaný fetální hematokrit je 50 %) [48].

Události, při kterých by měl být podán imunoglobulin (Ig) G anti-D RhD negativním ženám, nejsou-li u nich již přítomny aloprotilátky anti-D

Indikace v 1. trimestru

postačující dávka IgG anti-D **50 µg***

umělé ukončení těhotenství

samovolný potrat s instrumentální revizí dutiny děložní

operace mimoděložního těhotenství

biopsie choria z genetické indikace

evakuace molární gravidity

Indikace ve 2. a 3. trimestru

postačující dávka IgG anti-D **100 µg***

amniocentéza

kordocentéza

jiné invazivní výkony prenatální diagnostiky a fetální terapie

samovolný nebo indukovaný abort

intrauterinní úmrtí plodu

pokus o zevní obrát konce pánevního

břišní poranění

porodnické krvácení

Antepartální profylaxe ve 28. týdnu

postačující dávka IgG anti-D **250 µg***

Porod RhD pozitivního plodu **

postačující dávka IgG anti-D **100 µg***

Obrázek č. 1

Události, při kterých by měl být podán imunoglobulin IgG anti-D RhD negativním ženám, nejsou-li u nich již přítomny aloprotilátky anti-D

Načasování: co nejdříve, ale nejpozději do 72 hodin po události. Při opomenutí provedení prevence RhD aloimunizace do 72 hodin po potenciálně senzibilizující události má ještě smysl podat IgG anti-D do 13 dní, v mimořádných případech je doporučeno podání s odstupem maximálně 28 dní po porodu.

Upraveno dle Ľubušký M. et al. [48]

Inkompatibilita v dalších systémech

International Society of Blood Transfusion (ISBT) eviduje více než 33 krevních systémů a více než 300 erytrocytárních antigenů. Kromě antigenů RH systému může způsobit klinicky závažnou HDFN inkompatibilita v Kell, Duffy, MNS, P systému.

klinicky **NEJVÝZNAMNĚJŠÍ** antierytrocytární protilátky

aloprotilátky proti antigenům **D, c, K**

klinicky **VÝZNAMNÉ** antierytrocytární protilátky

aloprotilátky proti antigenům **C, E, e, Ce, cE, Fy^a, Jk^a, A, B, C^w, ce, G, k, S, s**

velmi zřídka proti antigenům **C^x, E^w, M, U, Fy^b, Kp^{a,b}, Js^{a,b}, PP, P^k, Jk^b, Tj^a, Yt^a, LW, Di, Ge, En^a, Jr^a, Wr^a** a další

klinicky **NEVÝZNAMNÉ** antierytrocytární protilátky

aloprotilátky proti antigenům **P₁, Le^{a,b}, H, I, HI, N, Lu**

nespecifické protilátky

chladové protilátky

protilátky reagující pouze v enzymovém prostředí

Obrázek č. 2

Rozdělení antierytrocytárních aloprotilátek u těhotných žen z hlediska klinického významu pro riziko rozvoje hemolytické nemoci plodu a novorozence

Upraveno dle Holusková I. et al. [36]

4.2.1 Patofyziologie HDFN

Podkladem HDFN je tvorba aloimunních protilátek proti erytrocytům během těhotenství při inkompatibilitě erytrocytárních antigenů matky a plodu. Při porušení fyziologické bariéry mezi fetální a mateřskou cirkulací mohou pronikat krvinky plodu do oběhu matky (fetomaternální hemoragie), což vede ke stimulaci imunitního aparátu matky a k tvorbě specifických protilátek třídy IgG (aloimunizace). Aloimunizace může být způsobena i podáním inkompatibilní krevní transfúze. IgG protilátky pronikají placentou do oběhu plodu, na aktivním transportu mateřského IgG se podílejí placentární Fc receptory označované jako FcRn. Plod je ohrožen rozvoje HDFN pouze v případě, má-li na svých erytrocytech přítomen k dané protilátce komplementární antigen. V tomto případě protilátky obalují fetální erytrocyty, které jsou pak destruovány monocyto-makrofágovým systémem převážně ve slezině.

Plod

Při hemolýze vzniká nadměrné množství nekonjugovaného bilirubinu, který se dostává do jater matky, zde je konjugován. Na anémii plod reaguje zvýšenou erytropoézou, především extramedulární, což může vést k portální hypertenzi a jaterní dysfunkci, následně ke tkáňové hypoxii, při poruše jaterních funkcí k hypoproteinémii. Hypoalbuminémie je příčinou snížení onkotického tlaku, který pak vede k ascitu, až k hydropsu plodu. Nakonec může dojít k intrauterinní smrti plodu díky kardiovaskulárnímu selhání. U aloprotilátky anti-K se navíc uplatňuje i suprese fetální erytropoézy.

Novorozenec

Po porodu však játra nestačí vychytávat a konjugovat velkou nálož bilirubinu (játra plodu a novorozence do 3. - 4. dne tvoří jen velmi málo či skoro žádnou glukoronyltransferázu) a to zvyšuje jeho koncentraci v krvi. Nekonjugovaný bilirubin je rozpustný v tucích a má dobrou afinitu např. k buňkám CNS, což se bez léčby může projevit poškozením mozku novorozence tzv. kernikterem [62].

Klinické projevy HDFN u plodu a novorozence	
Projev	Příčina
PLOD	
anémie	hemolýza, suprese erythropoézy
hepatosplenomegalie	erytroidní hyperplazie při chronické anémii
edém, ascites, hydrops	chronická anémie
kardiální selhání	chronická anémie
intrauterinní úmrtí plodu	těžká anémie
NOVOROZENEC	
ikterus	degradace hemu, nízká schopnost konjugovat bilirubin
encefalopatie (porucha přijímání potravy, ztráta Morova reflexu, vyklenutá fontanela, křeče, hluchota, mentální retardace, spastická choreoatetóza, smrt)	jádrový ikterus, vysoká koncentrace bilirubinu
anémie	hemolýza, suprese erythropoézy
hepatosplenomegalie	erytroidní hyperplazie při chronické anémii
edém, ascites, hydrops	chronická anémie
kardiální selhání	chronická anémie

Obrázek č. 3

Klinické projevy hemolytické nemoci plodu a novorozence

Upraveno dle Masopoust J. et al. [62]

4.2.2 Management u novorozence s HDFN

Hyperbilirubinémie: je definována jako zvýšení koncentrace bilirubinu v krvi nad 25 $\mu\text{mol/l}$. Klinicky se projevuje ikterem, žlutým zbarvením sklér, později kůže a sliznic. U novorozence je ikterus obvykle patrný až při hodnotách bilirubinu nad 85 $\mu\text{mol/l}$. Objevuje se u 45-65 % zdravých novorozenců (fyziologická hyperbilirubinémie), ale může být projevem hemolytického onemocnění novorozence. K rozvoji ikteru u novorozence vede ukončení placentární clearance bilirubinu, snížená eliminační schopnost jater (zejména snížená aktivita uridyl-difosfoglukoronyltransferázy) při zvýšené zátěži bilirubinem v časném postnatálním období. Cílem léčebných opatření je předejít takovému vzestupu hladiny bilirubinu, který by ohrozil novorozence rozvojem jadrového ikteru.

TERAPIE

Fototerapie

zabraňuje růstu koncentrace bilirubinu, snižuje potřebu výměnné transfúze, snižuje toxicitu bilirubinu [60]. Indikací je koncentrace bilirubinu $\geq 60\text{-}70 \mu\text{mol/l}$ $< 340 \mu\text{mol/l}$.

Imunoterapie

profylaktické podání imunoglobulinů v dávce 0,5g/kg i. v. u dětí s hemolytickou nemocí nespĺňující kritéria pro výměnnou transfúzi může zabránit rychlejšímu vzestupu hladiny bilirubinu.

Výměnná transfúze

Představuje účinnou, ale invazivní eliminační metodu, při které dochází k odstranění významné části bilirubinu a v případě HDFN i senzibilizovaných erytrocytů a protilátek podílejících se na hemolýze. Provádění je vyhrazeno na neonatologická pracoviště Perinatologických center. U dítěte léčeného pro hyperbilirubinémii se nemá seřezávat pupečnickový pahýl, dokud není zcela vyloučena nutnost provedení výměnné transfúze [26].

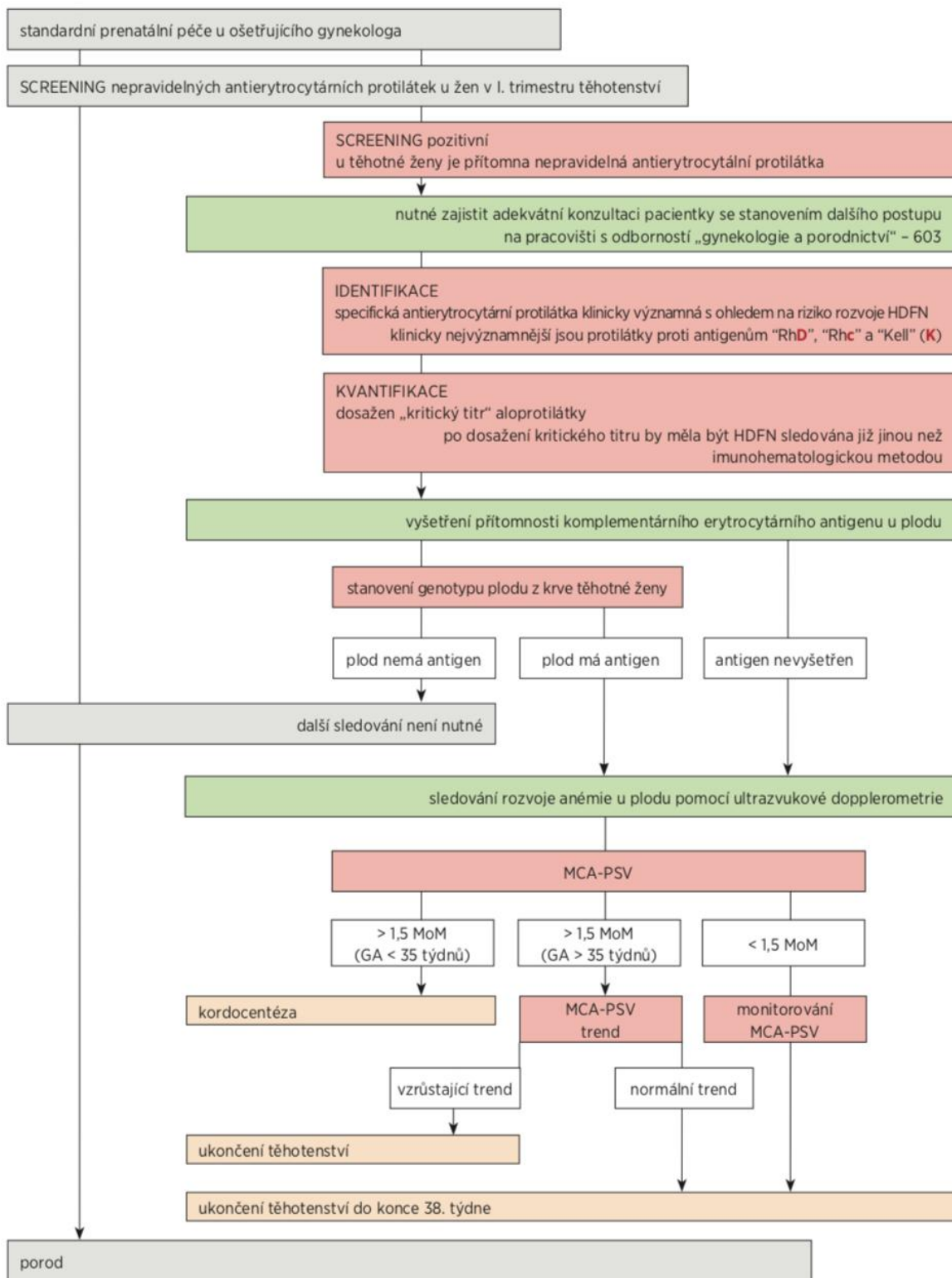
4.3 Management těhotenství s rizikem rozvoje HDFN

U všech těhotných žen v prvním trimestru by měl být do konce 14. týdne proveden screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek. Je-li výsledek screeningu jiný než negativní, je nezbytné zajistit adekvátní konzultaci pacientky se stanovením dalšího postupu na pracovišti s odborností gynekologie a porodnictví [46, 96]. V případě pozitivního screeningu by měla být provedena identifikace protilátky, a pokud se jedná o specifickou klinicky významnou aloprotilátku, tak by následně měla být provedena i její kvantifikace [36]. Z tohoto důvodu je vhodné provádět screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek v imunohematologické laboratoři, která je schopna rovněž provést i následné došetření protilátkového nálezu včetně identifikace a kvantifikace.

Zpráva z laboratoře by měla obsahovat informaci o klinické významnosti diagnostikované aloprotilátky z hlediska rizika rozvoje HDFN. Po dosažení „kritického titru“ by měla být HDFN sledována již jinou než imunohematologickou metodou, protože titr aloprotilátky nekoreluje se stupněm anémie plodu [37]. Je tudíž nezbytná mezioborová spolupráce gynekologa a imunohematologa. I když je u těhotné ženy diagnostikována klinicky významná aloprotilátka, je plod ohrožen rozvojem hemolytické nemoci pouze v případě, že má na povrchu svých erytrocytů přítomen komplementární antigen. Je možné doplnit vyšetření přítomnosti komplementárního erytrocytárního antigenu stanovením genotypu plodu z volné fetální DNA cirkulující v periferní krvi těhotné ženy. V České republice je v současnosti možno takto vyšetřit genotypy *RHD*, *RHCE* a *KEL* [7, 38-40]. Je tudíž nezbytná mezioborová spolupráce gynekologa a laboratoře lékařské genetiky. Pokud nelze vyloučit riziko rozvoje HDFN, měla by být pacientka s ohledem na riziko rozvoje anémie plodu sledována na specializovaném pracovišti, které se zabývá touto problematikou. Standardní prenatální péče by měla probíhat u ošetřujícího gynekologa [96]. Sledování rozvoje anémie u plodu se provádí pomocí ultrazvukové dopplerometrie, stanovením maximální průtokové rychlosti v arteria cerebri media (MCA-PSV, Middle Cerebral Artery Peak Systolic Velocity) [47, 55, 70, 84, 108].

Kordocentéza a následné vyšetření stupně anémie plodu by měla být provedena pouze v indikovaných případech. Těhotenství by mělo být ukončeno nejpozději do konce 38. týdne [51]. S ohledem na riziko rozvoje hemolytické nemoci novorozence je nezbytná mezioborová spolupráce gynekologa a neonatologa. Porod by měl být plánován v Perinatologickém centru intenzivní nebo intermediární péče. Ihned po porodu by u novorozence měl být vyšetřen: krevní obraz, bilirubin, krevní skupina - fenotyp (přítomnost antigenů na povrchu erytrocytů

novorozence podle typu aloprotilátky diagnostikované v těhotenství u matky), přímý antiglobulinový (Coombsův) test (přítomnost mateřských aloprotilátek navázaných na antigenně komplementární erytrocyty novorozence). Odběr krve u novorozence by měl být proveden přímo z pupečníku z umbilikální žíly bezprostředně po porodu [52, 53].



Obrázek č. 4

Management těhotenství s rizikem rozvoje hemolytické nemoci plodu a novorozence

Upraveno dle Ľubušký M.. et al. [53]

4.3.1 Screening nepravidelných antierytrocytárních aloprotilátek

V České republice (ČR) je u všech těhotných žen v I. trimestru prováděn screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek. Pozitivní výsledek screeningu je u cca **5 %** žen (v ČR ročně **5.000** žen), jen u cca **1,5 % (1.500)** žen se jedná o klinicky významnou aloprotilátku (obrázek číslo). Mezi klinicky významné antierytrocytární aloprotilátky patří **anti-D, anti-K, anti-c, anti-E**. Je-li diagnostikována klinicky významná antierytrocytární aloprotilátka, jedná se o těhotenství s rizikem rozvoje hemolytické nemoci plodu a novorozence [52].

METODY

Nepřímý antiglobulinový test (NAT) - screeningová metoda má obsahovat nepřímý antiglobulinový test za použití erytrocytů resuspendovaných v roztoku o nízké iontové síle (LISS-NAT) při 37 °C [12, 21, 42]. Za standardní metody jsou považovány: testy sloupcové aglutinace, testy „na pevné fázi“. Na základě dlouhodobých výsledků externí kontroly kvality je zřejmé, že lepších výsledků než zkumavková metoda dosahují robustnější metodiky sloupcové aglutinace a pevné fáze a tudíž by měly být preferovány [63] (obrázek číslo 5).

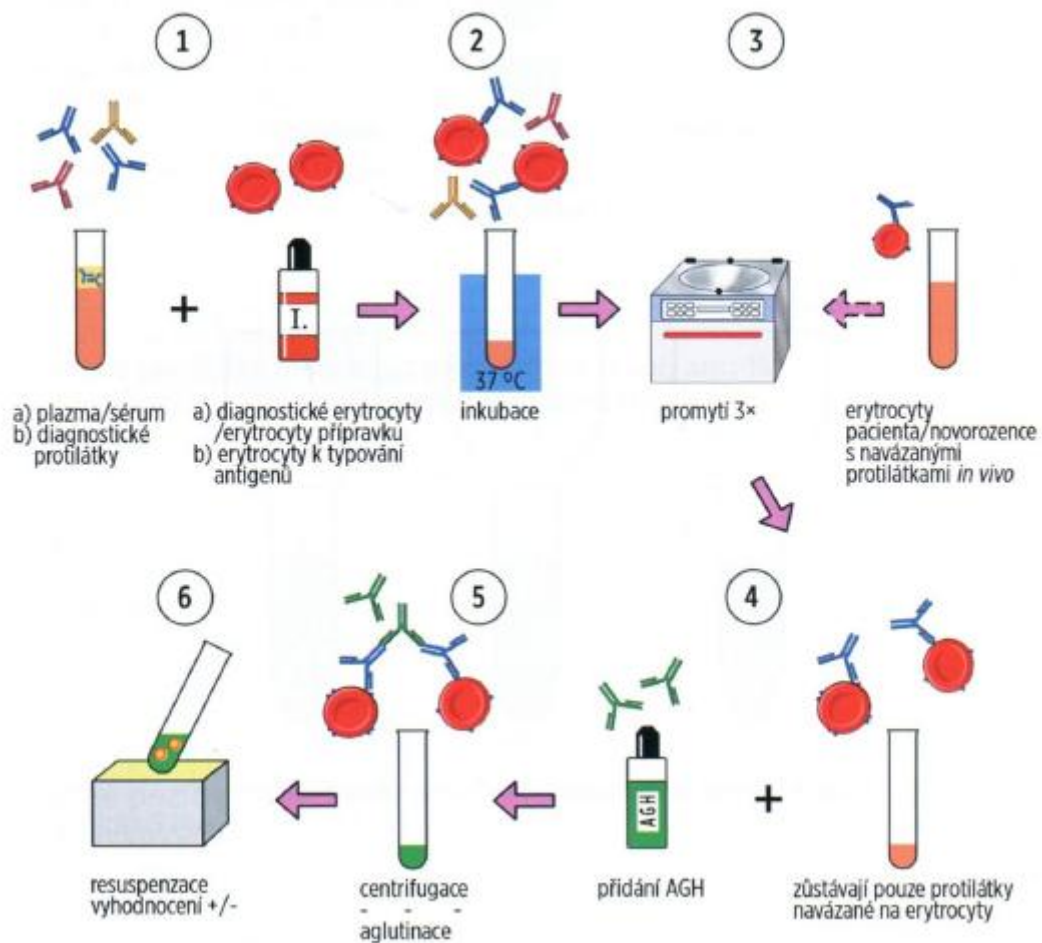
Enzymové testy - obvykle nejsou doporučovány, neboť nemají výpovědní hodnotu [17]. U enzymových testů se často setkáváme s falešnými pozitivitami, s protilátkami jiné třídy než IgG a s protilátkami, které reagují pouze s erytrocyty modifikovanými enzymy [61].

Identifikace nepravidelných antierytrocytárních protilátek - provádí se při pozitivním screeningu nepravidelných antierytrocytárních aloprotilátek. Jestliže se jedná o specifickou, klinicky významnou aloprotilátku, měla by být provedena i její kvantifikace [36]. Zpráva z laboratoře by měla obsahovat informaci o **klinické významnosti diagnostikované aloprotilátky** z hlediska rizika rozvoje HDFN.

Stanovení titru (kvantifikace) nepravidelných protilátek - má pro předvídání závažnosti HDFN jen omezený význam [21]. Není totiž jednoznačná korelace mezi výší titru a biologickým chováním protilátek in vivo. Hemolýza závisí na aviditě protilátky, méně na titru [32, 35, 106]. Protilátky s relativně nízkými titry jsou někdy schopné způsobit těžký průběh HDFN např. protilátky anti-K vedou k imunní supresi erythropoézy a výše jejich titru se

závažností anémie prakticky nekoreluje [100, 101]. Po dosažení „kritického titru“ by měla být HDFN sledována již jinou než imunohematologickou metodou, protože titr aloprotilátky nekoreluje se stupněm anémie u plodu [37].

Přímý antiglobulinový test (PAT) – doporučuje se provést u novorozence v případě průkazu klinicky významných antierytrocytárních aloprotilátek u matky [12, 107]. Pozitivita PAT nepotvrzuje diagnózu HON (Hemolytické onemocnění novorozence), je nutné vyšetření hemoglobinu a sérového bilirubinu novorozence (obrázek číslo 5).



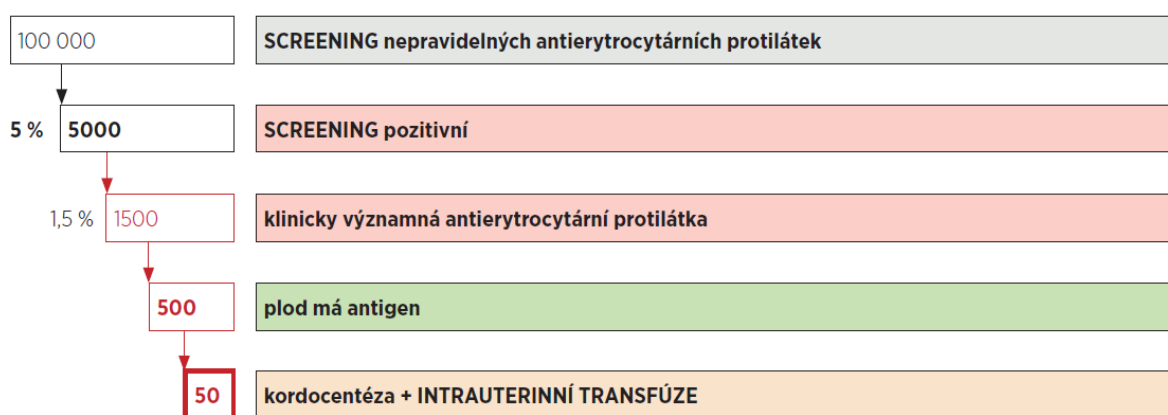
Obrázek č. 5

Přímý a nepřímý antiglobulinový test – zkumavková technika

Kroky 1-6 představují nepřímý antiglobulinový test – NAT, v případě přímého antiglobulinového testu – PAT se vstupuje přímo do promývací fáze.

AGH – anti-human globulin

Upraveno dle Řeháček V. et al. [82]



Obrázek č. 6

Screening těhotenství s rizikem rozvoje hemolytické nemoci plodu a novorozence

V České republice (ČR) je u všech těhotných žen v I. trimestru prováděn screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek. Pozitivní výsledek screeningu je u cca **5 %** žen (v ČR ročně **5.000** žen), jen u cca **1,5 %** (**1.500** žen) se jedná o klinicky významnou aloprotilátku. Je-li diagnostikována klinicky významná antierytrocytární aloprotilátka, jedná se o těhotenství s rizikem rozvoje hemolytické nemoci plodu a novorozence. Plod je však ohrožen rozvojem hemolytické nemoci pouze v případě, že má na povrchu svých erytrocytů přítomen komplementární antigen, jedná se o cca **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 u cca 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 [52].

Upraveno dle Ľubušký et al. [52]

antierytrocytární protilátky		incidence	
		n	%
pravidelné			
nepravidelné			
	chladové		
	tepelné	2184	4,81
	autoprotilátky		
	aloprotilátky		
	nespecifické		
	specifické	1022	2,25
	klinicky nevýznamné		
	klinicky významné		
screening	transfúzní kompatibilita		
	HDFN	683	1,50
	identifikace		
	kvantifikace		

Obrázek č. 7

Screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek u žen v I. trimestru těhotenství v olomouckém regionu v letech 2000 až 2011

Celkem bylo vyšetřeno 45 435 těhotných žen v I. trimestru těhotenství, pravidelné antierytrocytární protilátky (anti-A, anti-B) nebyly při screeningu vyšetřovány, u 4,81 % žen byl screening nepravidelných tepelných antierytrocytárních protilátek pozitivní a bylo následně nutné provést identifikaci protilátek. U 2,25 % žen byla protilátka identifikována a u 1,5 % žen se jednalo z hlediska možného rozvoje HDFN o specifickou klinicky významnou aloprotilátku, kterou bylo tudíž nutné i kvantifikovat. Uvedený výpočet incidence jednotlivých typu protilátek nezohledňuje možnost současného výskytu více typu specifických aloprotilátek u jedné těhotné ženy.

HDFN (Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn) – hemolytická nemoc plodu a novorozence

Upraveno dle Holusková I. et al [37]

4.3.2 Neinvazivní stanovení genotypu plodu z periferní krve těhotné ženy

Pokud je u těhotné ženy diagnostikována klinicky významná aloprotilátka, je plod ohrožen rozvojem hemolytické nemoci pouze v případě, že má na povrchu svých erytrocytů přítomen komplementární antigen. Je možné doplnit vyšetření přítomnosti komplementárního erytrocytárního antigenu stanovením genotypu plodu z volné fetální DNA cirkulující v periferní krvi těhotné ženy. V České republice je v současnosti možno takto vyšetřit genotypy *RHD*, *RHCE* a *KEL* [6, 7, 38-40].

Pro neinvazivní stanovení genotypu plodu se využívá nebuněčná fragmentovaná fetální DNA přítomná v plazmě těhotných žen. Procentuální zastoupení volné fetální DNA v plazmě gravidních žen je velmi variabilní a pohybuje se nejčastěji v rozmezí 5–10 % v závislosti na délce gravidity, velikosti placenty, hmotnosti ženy i plodu, patologickém těhotenství apod [7, 74]. Stanovení genotypu plodu se v současnosti nejčastěji provádí metodou real-time PCR. Stanovení *KEL* genotypu plodu je možné i pomocí minisekvenace.

Real – time PCR = Kvantitativní polymerázová řetězová reakce

metoda založena na principu klasické PCR, umožňuje však kvantifikaci sledovaného úseku DNA v reálném čase. Na rozdíl od běžné PCR, kde se analyzuje až výsledný produkt (amplifikovaná DNA) pomocí elektroforézy v agaróze, je při Real-time PCR zaznamenáván každý cyklus PCR ve skutečném čase. Záznam amplifikace je založen na principu fluorescence, kdy se používají sondy (fluorescenční látky), které se váží specificky nebo nespecificky na amplifikovanou DNA.

Minisekvenace s využitím kapilární elektroforézy (tzv. SNaPshot)

analýza je založena na prodloužení sekvenčně specifického DNA primeru o jednu bázi v místě *KEL* polymorfismu (*K/k*). Na základě inkorporované fluorescenčně značené báze lze u *KEL* homozygotních těhotných žen (*k/k* nebo *K/K*) určit příměs komplementární fetální alely (*K* nebo *k*) a detekcí fluorescence příslušné báze stanovit *KEL* genotyp plodu.

4.3.3 Sledování rozvoje anémie u plodu pomocí ultrazvukové dopplerometrie

Stanovení maximální systolické průtokové rychlosti v arteria cerebri media (MCA PSV) pomocí dopplerometrie představuje vysoce sensitivní neinvazivní způsob zjištění stupně fetální anémie [55]. Umožňuje přesnější predikci stupně fetální anémie při erytrocytární aloimunizaci než provedení amniocentézy s následným měřením koncentrace bilirubinoidů v plodové vodě [13, 57, 69, 71, 76, 79]. Stanovením MCA PSV lze diagnostikovat anémii i v případech Kell aloimunizace, kde problém nespočívá v hemolýze ale v supresi erytroidních prekurzorů v kostní dřeni, proto měření bilirubinoidů z plodové vody nemá v případě Kell aloimunizace žádný význam [4, 14, 54, 97]. Využití MCA-PSV ukazuje obrázek číslo 9. Anémie vede k poklesu objemového množství kyslíku v krvi, ale neovlivňuje parciální tlaky kyslíku a oxidu uhličitého. V krvi plodu zůstávají hodnoty pO₂, pCO₂ a pH obvykle v mezích normálních hodnot. Nedochozí proto k redistribuci krve s preferenčním zásobením mozku. Výjimku představuje až závažná anémie s hypoxémií a acidózou. Není-li současně přítomna placentární insuficience, nemění se pulzatilita v arteria uterina a v arteria umbilicalis bez ohledu na stupeň anémie plodu. Plod zvyšuje srdeční výdej a krevní průtok ve fetálních cévách v přímé úměře stupni anémie odrážející se zejména v hematokritu plodu. Je přítomna hyperdynamická cirkulace [68]. Studie na animálních modelech prokázaly, že ke zvýšení průtokové rychlosti ve fetálních cévách při anémii dochází následkem zvýšení srdečního výdeje a poklesu viskozity krve [31]. Před podáním první intrauterinní transfuze se MCA-PSV u plodu zvyšuje v přímé úměře stupni anémie odrážející se zejména v koncentraci hemoglobinu. Ukazuje se, že počáteční mírný pokles koncentrace fetálního hemoglobinu jen nepatrně ovlivňuje srdeční výdej a krevní viskozitu. Při dalším prohlubování fetální anémie je vzájemný vztah mezi těmito parametry již lineární a umožňuje přesnější odhad aktuální hodnoty fetálního hemoglobinu [56]. V této fázi i minimální změna koncentrace hemoglobinu signifikantně ovlivní viskozitu krve. Výbornou korelaci mezi MCA-PSV a koncentrací fetálního hemoglobinu potvrdilo mnoho dalších studií [5, 13, 23, 28, 58, 65, 83, 92, 94, 97, 102]. Při předpovědi rizika rozvoje aloimunní anémie plodu u ohrožených těhotenství nehraje roli jen absolutní hodnota MCA-PSV ale také dynamika nárůstu maximální průtokové rychlosti během gestace. Čím je dynamika větší, tím závažnější je fetální hemolýza v důsledku aloimunizace a odpovídá stupni anémie plodu [24]. Po podání intrauterinní transfuze krve ke korekci fetální anémie byl zaznamenán intenzivní pokles maximální průtokové rychlosti v arteria cerebri media zpět k normálním hodnotám [92]. Adekvátní normalizace

průtokové rychlosti je patrná po podání první i následných krevních transfúzí. Jedná se zřejmě o důsledek vzestupu krevní viskosity a zlepšení oxygenace fetální krve s následným zvýšením srdečního afterloadu. MCA-PSV lze využít i k načasování podání další intrauterinní transfuze, ale referenční hladina (MCA-PSV cut-off point) pro detekci závažné fetální anémie po podání první transfúze je 1,69 MoM (vs. 1,5 MoM před podáním intrauterinní transfúze) [25]. Je to proto, že adultní erytrocyty podané při intrauterinní transfuzi mají ve srovnání s fetálními menší objem, buněčnou rigiditu a větší sklon k agregaci což ovlivňuje viskozitu krve [30, 104]. Adultní erytrocyty ve srovnání s fetálními mají navíc nižší transportní kapacitu pro kyslík. MCA-PSV detekující koncentraci hemoglobinu odpovídající závažné fetální anémii je proto mírně vyšší. Mari et al. [59] však prokázali lineární korelaci mezi MCA-PSV a koncentrací fetálního hemoglobinu i po podání dvou intrauterinních transfuzí. Před podáním první transfúze představují fetální erytrocyty 100% všech červených krvinek v oběhu plodu, po první transfúzi 3-82% a po druhé transfúzi jen 0-34% [59].

WEEK OF GESTATION	MULTIPLES OF THE MEDIAN			
	1.00 (MEDIAN)	1.29	1.50	1.55
		cm/sec		
18	23.2	29.9	34.8	36.0
20	25.5	32.8	38.2	39.5
22	27.9	36.0	41.9	43.3
24	30.7	39.5	46.0	47.5
26	33.6	43.3	50.4	52.1
28	36.9	47.6	55.4	57.2
30	40.5	52.2	60.7	62.8
32	44.4	57.3	66.6	68.9
34	48.7	62.9	73.1	75.6
36	53.5	69.0	80.2	82.9
38	58.7	75.7	88.0	91.0
40	64.4	83.0	96.6	99.8

Obrázek č. 8

Referenční tabulka pro měření maximální průtokové rychlosti v arteria cerebri media (MCA PSV) pomocí ultrazvukové dopplerometrie

Upraveno dle Mari, G. et al. [55]

Potential causes of fetal anemia	
Categories	Cause
Immune	Red blood cell alloimmunization Rh Atypical antigens
Infectious	Parvovirus CMV Toxoplasmosis Syphilis
Inherited	Lysosomal storage diseases (eg, mucopolysaccharidosis type VII, Niemann-Pick disease, Gaucher disease) Blackfan-Diamond anemia Fanconi anemia Alpha-thalassemia ^a Pyruvate kinase deficiency G-6-PD deficiency
Other	Aneuploidy TTTS; twin anemia-polycythemia sequence Fetomaternal hemorrhage Maternal acquired red cell aplasia

CMV, cytomegalovirus; G-6-PD, glucose-6-phosphate dehydrogenase; TTTS, twin-to-twin transfusion syndrome.

^a Alpha-thalassemia is a common cause of hydrops in regions where this inherited disorder is common, such as Southeast Asia.

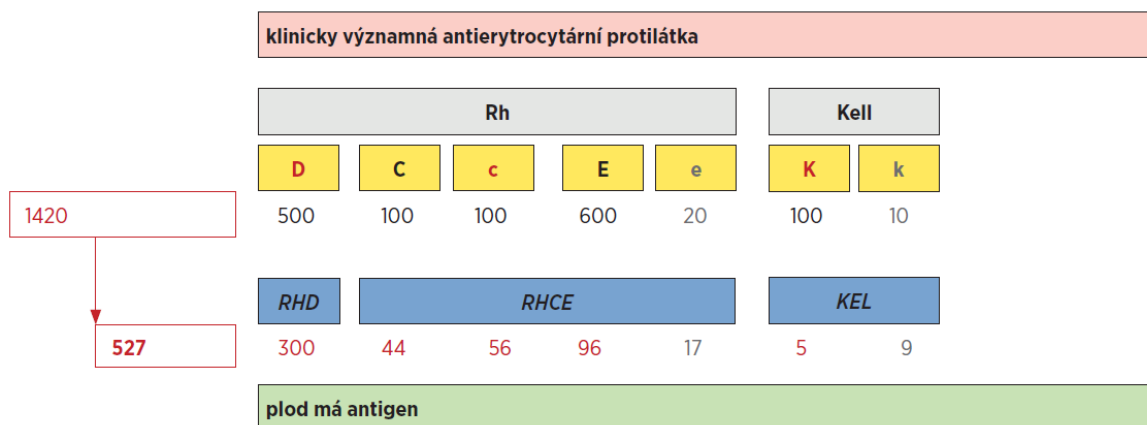
Obrázek č. 9

Možné příčiny fetální anémie, při kterých je možné využití sledování pomocí ultrazvukové dopplerometrie maximální průtokové rychlosti v arteria cerebri media (MCA PSV)

Upraveno dle Society for Maternal-Fetal Medicine [88]

4.4 Klinický význam stanovení *KEL* a *RHCE* genotypu plodu u aloimunizovaných těhotných žen

I když je u těhotné ženy diagnostikována klinicky významná aloprotilátka, je plod ohrožen rozvojem hemolytické nemoci pouze v případě, že má na povrchu svých erytrocytů přítomen komplementární antigen. Je možné doplnit vyšetření přítomnosti komplementárního erytrocytárního antigenu stanovením genotypu plodu z volné fetální DNA cirkulující v periferní krvi těhotné ženy. V České republice je v současnosti možno takto vyšetřit genotypy *RHD*, *RHCE* a *KEL* [6, 7, 38-40].



Obrázek č. 10

Klinický význam stanovení *RHCE* a *KEL* genotypu u plodu

Klinicky významná aloprotilátka anti-D je diagnostikována u cca **0,5 %** žen (v ČR ročně **500** žen). Plod je však ohrožen rozvojem hemolytické nemoci pouze v případě, že má na povrchu svých erytrocytu přítomen komplementární antigen, jedná se o cca 60 % plodu (**300** plodu ročně). Přítomnost komplementárního antigenu lze vyšetřit neinvazivně stanovením *RHD* genotypu plodu z volné fetální DNA cirkulující v periferní krvi těhotné ženy. Klinicky významná aloprotilátka anti-C je diagnostikována u cca **0,1 %** žen (v ČR ročně **100** žen) a cca 44 % plodu (**44** plody ročně) mají přítomen komplementární antigen. Rovněž klinicky významná aloprotilátka anti-c je diagnostikována u cca **0,1 %** žen (v ČR ročně **100** žen) a cca 56 % plodu (**56** plodu ročně) má přítomen komplementární antigen. Přítomnost komplementárního antigenu lze vyšetřit neinvazivně stanovením *RHCE* genotypu plodu z volné fetální DNA cirkulující v periferní krvi těhotné ženy. Klinicky významná aloprotilátka anti-E je diagnostikována nejčastěji, u cca **0,6 %** žen (v ČR ročně **600** žen), může však vznikat i přirozeně bez erytrocytárního antigenního podnětu, takto vzniklá protilátka není aloprotilátkou a je otázkou, zda vůbec může způsobit rozvoj hemolytické nemoci. Navíc jen cca 16 % plodu (**96** plodu ročně) má přítomen komplementární antigen. 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 cca 0,02 % žen (v ČR ročně 20 žen) a komplementární antigen je přítomen u většiny plodů, u cca 84 % plodu (17 plodu ročně). Vyšetření přítomnosti komplementárního antigenu neinvazivně stanovením *RHCE* genotypu plodu tudíž nemá klinický význam. Klinicky významná aloprotilátka anti-K (Kell, KEL1) je diagnostikována u cca **0,1 %** žen (v ČR ročně **100** žen) a cca 5 % plodu (**5** plodu ročně) má přítomen komplementární antigen. Přítomnost komplementárního antigenu lze vyšetřit neinvazivně stanovením *KEL* genotypu plodu z volné fetální DNA cirkulující v periferní krvi těhotné ženy. Naproti tomu klinicky významná aloprotilátka anti-k (Cellano, KEL2) je diagnostikována jen u cca 0,01 % žen (v ČR ročně 10 žen) a komplementární antigen je přítomen u většiny plodu, u cca 95 % plodu (9 plodu ročně). Vyšetření přítomnosti komplementárního antigenu neinvazivně stanovením *KEL* genotypu plodu tudíž nemá klinický význam.

Upraveno dle Lubušký at al. [52, 53], Holusková I. et al. [37]

4.4.1 Rh systém (ISBT 004)

Je druhý nejvýznamnější systém krevních skupin, objevený Landsteinerem v roce 1939, když v séru ženy po porodu objevil protilátku proti antigenu plodu, jež zdědil po otci [75, 91]. K nejvýznamnějším antigenům Rh systému, kterých je identifikovaných více než 50 [86], patří antigeny “D“, “C“, “c“, “E“, “e“. K tvorbě protilátek proti antigenům Rh systému dochází vždy až po stimulaci imunitního systému antigeně inkompatibilními erytrocyty po podání krevní transfuze nebo následkem fetomaternální hemoragie v souvislosti s těhotenstvím [36, 75].

RH antigeny jsou kódovány dvěma blízko sebe ležícími homologními geny *RHD* a *RHCE*, které podléhají autosomálně dominantnímu typu dědičnosti a jsou umístěny na krátkém raménku 1. chromozomu. *RHD* a *RHCE* geny kódují proteiny RhD a RhCcEe, které jsou oba tvořeny polypeptidovým řetězcem o 417 aminokyselinách, který 12krát prochází erytrocytární membránou. Na vnější straně vytváří šest smyček, kde jdou lokalizovány vlastní antigeny. RhD a RhCcEe protein se od sebe liší 31 až 35 aminokyselinami. *RHD* gen produkuje “D“ antigen, *RHCE* gen produkuje antigeny “C“, “c“, “E“, “e“ [19, 36].

Gen *RHCE* má čtyři alely CE, Ce, cE, ce, které jsou vůči sobě kodominantní a uvedené kombinace alel se dědí neoddělitelně od sebe, proto název genový komplex. Může tak vzniknout až osm genových komplexů (haplotypů): CDe, cde, cDE, cDe, Cde, cdE, CDE, CdE, řazeno sestupně dle výskytu u kavkazské populace. Dvojice těchto genových komplexů jako např. CDe/cde potom určuje genotyp. Některé genotypy a odpovídající fenotypy, se vyskytují častěji než jiné. Nejčastější genotypy jsou CDe/cde a CDe/CDe a představují přibližně 55 % genotypů kavkazské rasy [3, 36].

Pro expresi všech Rh antigenů je nezbytná RhAG (Rh-associated glykoprotein), který je kódován *RHAG* genem lokalizovaným na krátkém raménku 6. chromozomu. Rh antigeny jsou exprimovány pouze na buňkách erytroidní linie a na fetálních erytrocytech jsou exprimovány již od 6. gestačního týdne. Velmi vzácně mohou Rh antigeny na erytrocytech zcela chybět a potom hovoříme o tzv. Rh null fenotypu [36].

Antigeny “C“, “c“ a “E“, “e“ / protilátky anti-C, anti-c, anti-E, anti-e

Antigeny “C“, “c“ a “E“, “e“ jsou mnohem méně imunogenní než antigen “D“. Všechny protilátky proti antigenům Rh systému by měly být považovány za schopné způsobit závažnou formu HDFN. Klinicky nejvýznamnější z non-RhD protilátek je protilátka anti-c, která je schopná způsobit závažnou formu HDFN. Velmi často jde o opožděnou hemolýzu.

Její hemolytický potenciál je velmi podobný protilátce anti-D [34, 105]. Až v polovině případů je jako příčina aloimunizace popisována inkompatibilní transfuze [8]. Protilátky anti-C, anti-E, anti-e mohou rovněž způsobit HDFN, ale většinou mírnou formu a závažnou hemolýzu způsobují jen zřídka [10, 34, 41, 95, 98].

Incidence antigenů “C“, “c“, “E“, “e“ v populaci

Antigen “C“ je přítomen u 68 % bělošské populace, 17 % černošské populace a u 94 % obyvatel dálného východu. Antigen “c“ je přítomen u 81 % bělošské populace, 99% černošské populace a u 43 % obyvatel dálného východu. Antigen “E“ je přítomen u 29 % bělošské populace, 23 % černošské populace a u 36 % obyvatel dálného východu. Antigen “e“ je přítomen u 98 % bělošské populace, 99 % černošské populace a u 96 % obyvatel dálného východu [20].

Incidence protilátek anti-C, anti-c, anti-E, anti-e u těhotných žen

Holusková a kolektiv uvádí incidenci aloprotilátky anti-E (5,7 ‰), anti-C (1,2 ‰), anti-c (0,6 ‰), anti-e (0,1 ‰) [37].

Geifman-Holtzman a kolektiv uvádí incidenci aloprotilátky E (2,0 ‰), anti-C (0,7 ‰), anti-c (0,8 ‰) [33].

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 **0,1 %** cca **100** těhotných žen ročně v České republice
pravděpodobnost přítomnosti antigenu "c" u plodu **56 %** **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 **0,1 %** cca **100** těhotných žen ročně v České republice
pravděpodobnost přítomnosti antigenu "C" u plodu **44 %** **56 %** cca **56** plodů není ohroženo hemolytickou nemocí

Obrázek č. 11

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 u cca 0,1 % žen (v ČR ročně **100** žen), cca 56 % plodů (**56** plodů ročně) však nemá přítomen komplementární antigen, a tudíž nejsou ohroženy rozvojem HDFN. Rovněž klinicky významná aloprotilátka **anti-c** je diagnostikována u cca 0,1 % žen (v ČR ročně **100** žen) a cca 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 dle Holusková I. [37], Kratochvílová T. [43] a Reid M. [80].

Rh systém (ISBT 004)
systém Rh je tvořen více než 50 antigeny
k nejvýznamnějším antigenům Rh systému patří:

"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 erytrocyty (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 erytrocyty (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 erytrocytárním 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 erytrocytárním 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

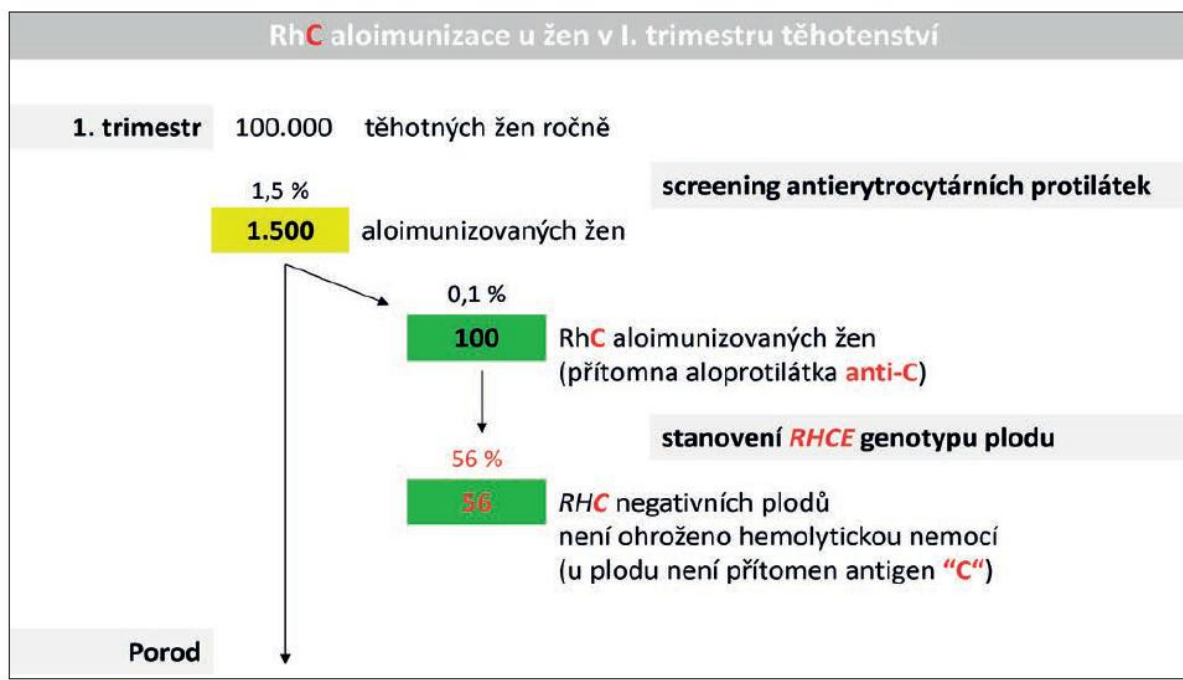
Obrázek č. 12

Klinický význam stanovení varianty genu *RHCE*, která odpovídá přítomnosti erytrocytárního antigenu "E"/"e" u plodu

V České republice je u všech těhotných žen v I. trimestru prováděn screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek. Klinicky významná aloprotilátka **anti-E** je diagnostikována nejčastěji, u cca 0,6 % žen (v ČR ročně **600** žen). Navíc, cca 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 cca 0,02 % žen (v ČR ročně **20** žen) a komplementární antigen je přítomen u většiny plodů, u cca 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.

HDFN (Hemolytic disease of the fetus and newborn) - hemolytická nemoc plodu a novorozence).

Upraveno dle Holusková I. [37], Kratochvílová T. [43] a Reid M. [64].



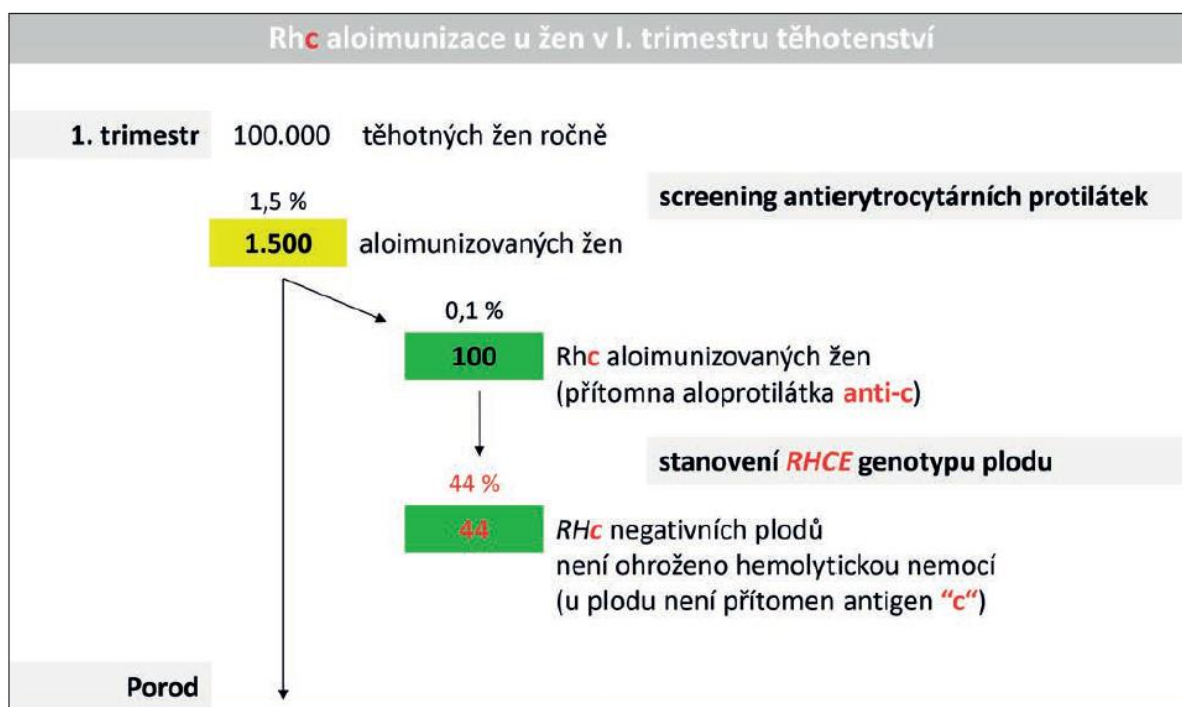
Obrázek č. 13

Klinický význam stanovení varianty genu *RHCE*, která odpovídá přítomnosti erytrocytárního antigenu "C"

V České republice je u všech těhotných žen v I. trimestru prováděn screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek. Klinicky významná aloprotilátka anti-C je diagnostikována u cca 0,1 % žen (v ČR ročně 100 žen), cca 56 % plodů (56 plodů ročně) však nemá přítomen komplementární antigen, a tudíž není ohroženo rozvojem HDFN.

HDFN (Hemolytic disease of the fetus and newborn) - hemolytická nemoc plodu a novorozence).

Upraveno dle Holusková I. et al. [37], Kratochvílová et al. [43]



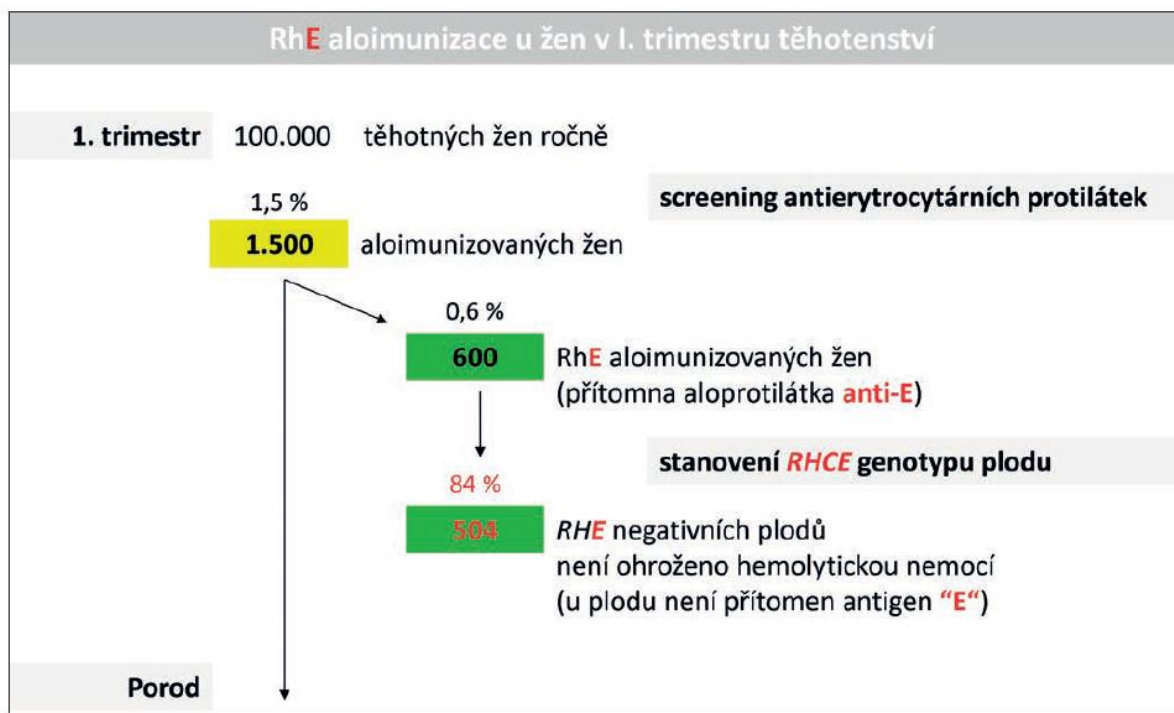
Obrázek č. 14

Klinický význam stanovení varianty genu *RHCE*, která odpovídá přítomnosti erytrocytárního antigenu "c"

V České republice je u všech těhotných žen v I. trimestru prováděn screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek. Klinicky významná aloprotilátka anti-c je diagnostikována u cca 0,1 % žen (v ČR ročně 100 žen) u cca 44 % plodů (44 plodů ročně) není přítomen komplementární antigen, a tudíž není ohroženo rozvojem HDFN

HDFN (Hemolytic disease of the fetus and newborn) - hemolytická nemoc plodu a novorozence).

Upraveno dle Holusková I. et al.[37], Kratochvílová T. et al. [43]



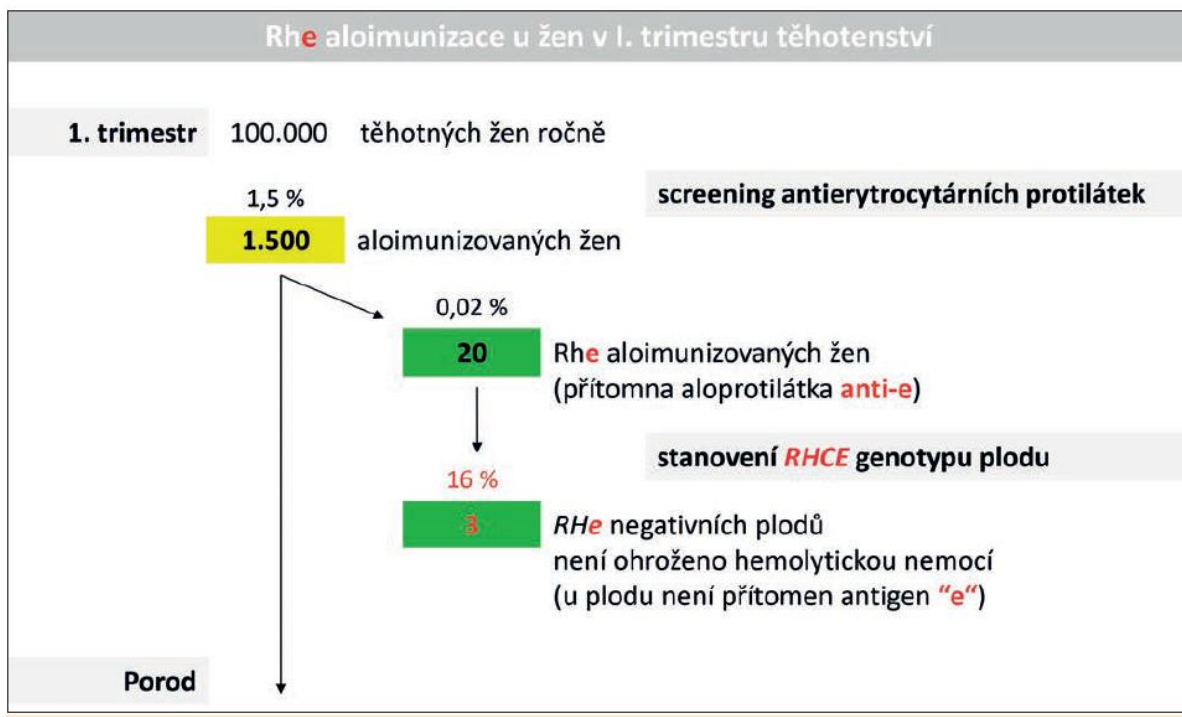
Obrázek č. 15

Klinický význam stanovení varianty genu *RHCE*, která odpovídá přítomnosti erytrocytárního antigenu "E"

V České republice je u všech těhotných žen v I. trimestru prováděn screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek. Klinicky významná aloprotilátka anti-E je diagnostikována nejčastěji, u cca 0,6 % žen (v ČR ročně 600 žen). Navíc, cca 84 % plodů (504 plodů 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.

HDFN (Hemolytic disease of the fetus and newborn) - hemolytická nemoc plodu a novorozence).

Upraveno dle Holusková I. et al. [37], Kratochvílová T. et al. [43]



Obrázek č. 16

Klinický význam stanovení varianty genu *RHCE*, která odpovídá přítomnosti erytrocytárního antigenu "e" u plodu

V České republice je u všech těhotných žen v I. trimestru prováděn screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek. Klinicky významná aloprotilátka anti-e je diagnostikována jen u cca 0,02 % žen (v ČR ročně 20 žen) a komplementární antigen je přítomen u většiny plodů, u cca 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.

HDFN (Hemolytic disease of the fetus and newborn) - hemolytická nemoc plodu a novorozence).

Upraveno dle Holusková I. et al. [37] Kratochvílová T. et al. [43]

4.4.2 Kell systém (ISBT 006)

Systém Kell je tvořen 27 antigeny a každý z nich je označen jménem, zkratkou a číslem, (např. Kell, K, KEL1). Tento antigenní systém byl objeven v roce 1946 hned po objevení antiglobulinového testu. Nejběžnější antigeny spojené s HDFN jsou alelické antigeny Kell (K, KEL1) a Cellano (k, KEL2) [22, 36].

KEL gen je lokalizován na 7. chromozomu, je organizován 19 exony v kódující sekvenci a je vysoce polymorfní. *KEL* gen má 2 hlavní kodominantní alely K a k, které jsou výsledkem jednonukleotidového polymorfismu (698T→C) a korespondující antigeny “K“ a “k“ se liší jednou aminokyselinou (M193T) [22]. *KEL* gen kóduje Kell glykoprotein, který prostupuje erytrocytární membránou pouze jednou a extramembránově má velkou doménu, na které se exprimují všechny antigeny systému Kell. Kell glykoprotein je strukturální a sekvenční homolog s rodinou na zinku závislých neutrálních endopeptidáz, což naznačuje, že zřejmě hraje významnou roli v růstu a diferenciaci erytrocytů [36, 67].

Kell glykoprotein je asociován s XK proteinem, který 10krát prochází erytrocytární membránou a jsou na něm lokalizovány antigeny “K_x“ a “K_m“. Velmi vzácné chybění XK proteinu výhradně u chlapců je zodpovědno za tzv. McLeodův fenotyp, kdy chybí antigeny “K_x“ a “K_m“ a ostatní Kell antigeny jsou exprimovány velmi slabě. Přítomnost XK proteinu v membráně erytrocytů při současném chybění celého Kell glykoproteinu se označuje jako vzácný Ko fenotyp. Jedinci s Ko fenotypem mohou produkovat protilátky anti-Ku, která může způsobit hemolýzu všech erytrocytů v jejichž membráně se Kell glykoprotein nachází [19, 22, 36].

Antigen “K“ / protilátka anti-K

Nejvíce imunogenním antigenem Kell systému je antigen “K“, který je po “D“ antigenem druhým nejvíce imunogenním antigenem [2, 18, 22, 103]. Protilátky anti-K mohou způsobovat závažnou formu HDFN. Nejčastější příčinou aloimunizace v Kell systému je inkompatibilní krevní transfuze. Závažnost HDFN lze jen obtížně předpovědět, protože korelace mezi titrem aloprotilátky anti-K a stupněm fetální anémie je jen velmi malá [1, 36]. Za signifikantně významný považuje Slotweg a kolektiv již titer ≥ 4 [85]. Byl popsán i případ těhotenství s hydropsem plodu v 17. týdnu těhotenství, kdy titer anti-K byl v 16. týdnu pouze 1:2 [99].

HDFN způsobená mateřskou aloprotilátkou anti-K se liší od HDFN způsobené aloprotilátkou anti-D, protože kromě hemolýzy inkompatibilních erytrocytů může aloprotilátka anti-K

způsobovat útlum krvetvorby jejich prekurzorů v kostní dřeni. "K" antigen je exprimován na erytroidních prekurzorech v porovnání s antigenem "D", který je exprimován na povrchu již zralých erytrocytů [19, 20, 36, 89].

HDFN způsobena aloprotilátkou anti-K je spojena s nižší hladinou bilirubinu v plodové vodě než HDFN způsobena aloprotilátkou anti-D a ani postnatálně nebývá přítomna významná hyperbilirubinémie. Nižší je i hladina retikulocytů a erytroblastů. Tyto údaje nasvědčují tomu, že u stejně závažné HDFN způsobené anti-K ve srovnání s HDFN způsobené anti-D je menší podíl hemolýzy [20, 36].

Incidence antigenu "K" v populaci

Antigen "K" se vyskytuje u 10 % bělošské populace a u 2 % černošské populace. V Arábii a na Sinajském poloostrově je incidence "K" antigenu až 25 %. K pozitivní jedinci se dělí na heterozygoty pro alelu K (K/k) – 98 % bělochů a téměř 100 % černošské populace a homozygoty pro alelu K (K/K) [36, 60].

Incidence protilátky anti-K u těhotných žen

Holusková a kolektiv uvádí incidenci aloprotilátky anti-K (1,2 ‰) [37]. Geifman-Holtzman a kolektiv uvádí incidenci aloprotilátky anti-K (3,0 ‰) [33]. Výskyt anti-K protilátky se v posledních letech zvýšil z 1,6/1000 v polovině 60. let 20. století na 3,2/1000 do roku 1995 [33, 67, 78].

Incidence "K" inkompatibilních těhotenství

U bělošské populace má K negativní žena (90 %), pravděpodobnost 10 %, že její partner bude K pozitivní (většinou heterozygot pro alelu K), a tudíž 5 % pravděpodobnost, že bude mít K pozitivní plod [22, 36, 67].

Antigen "k" / protilátka anti-k

Jde o vysokofrekventní antigen, naopak incidence aloprotilátky anti-k u těhotných žen je velmi nízká. Z hlediska rizika rozvoje HDFN je aloprotilátka anti-k řazena mezi významné aloprotilátky, avšak vzhledem k velmi nízkému výskytu u těhotných žen lze klinický význam pro riziko rozvoje HDFN jen velmi obtížně posoudit [9, 27, 36, 44, 45].

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		aloprotilátka	
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 ohrožen hemolytickou nemocí

Obrázek č. 17

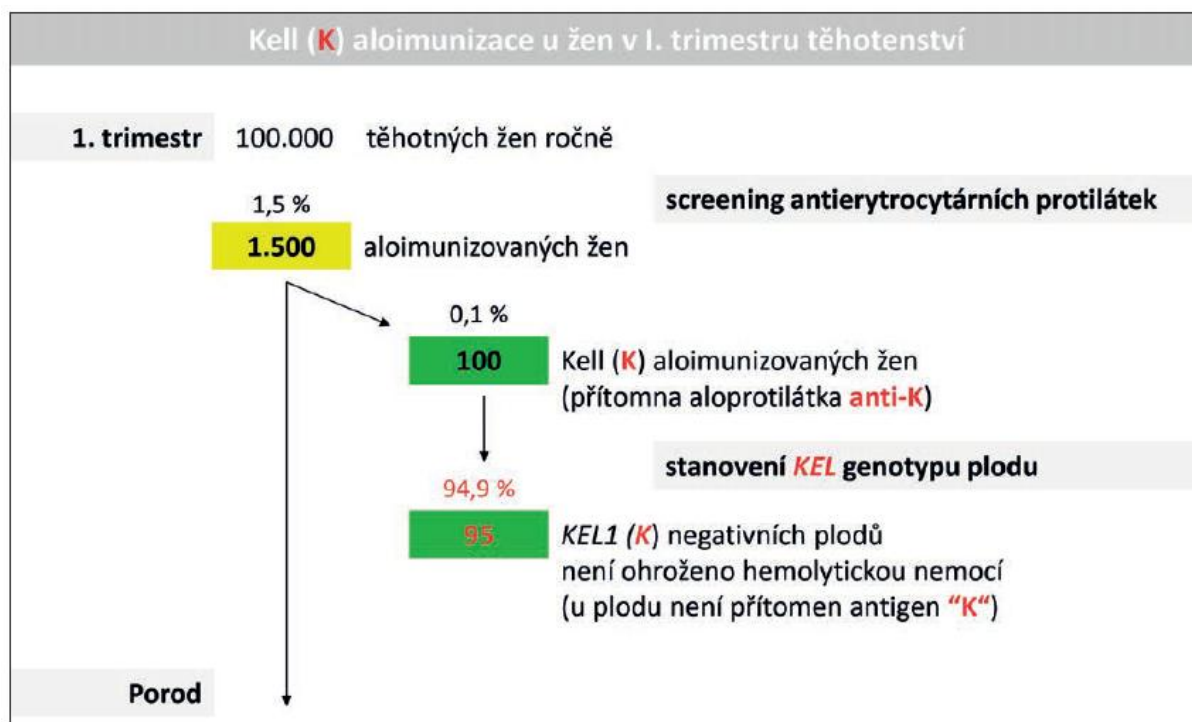
Klinický význam stanovení KEL genotypu plodu u aloimunizovaných žen

V České republice je u všech těhotných žen prováděn screening nepravidelných antierytrocytárních aloprotilátek. Klinicky významná aloprotilátka anti-K je diagnostikována u cca 0,1 % žen (v ČR ročně cca **100** žen) Plod je však ohrožen rozvojem HDFN pouze v případě, že má na povrchu erytrocytů přítomen komplementární antigen, jedná se o cca 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 minisekvance.

Naproti tomu klinicky významná aloprotilátka anti-k je diagnostikována jen u cca 0,01 % žen (v ČR ročně **10** žen) a komplementární antigen je přítomen u většiny plodů, u cca 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.

HDFN (Hemolytic disease of the fetus and newborn) - hemolytická nemoc plodu a novorozence).

Upraveno dle Holusková I. et al. [37], Durdová V. et al. [29] a McKenna D. S. et al. [64]



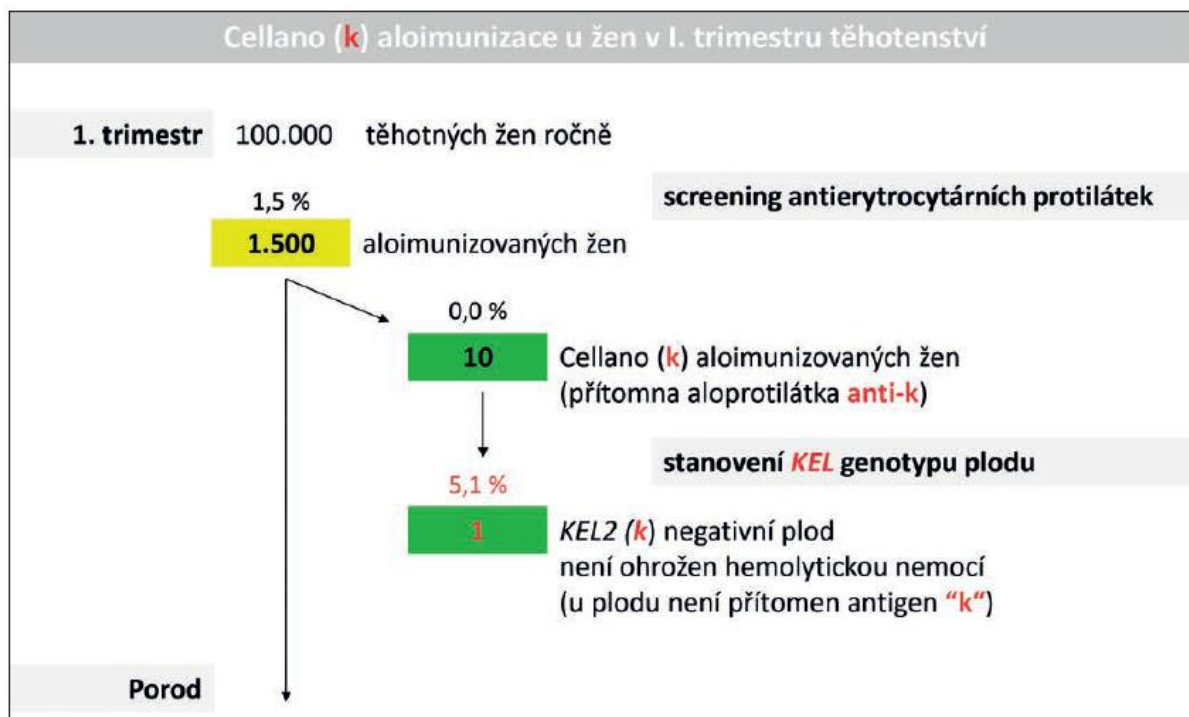
Obrázek č. 18

Klinický význam stanovení alely *KEL1*, která odpovídá přítomnosti erytrocytárního antigenu "K"

V České republice je u všech těhotných žen prováděn screening nepravidelných antierytrocytárních aloprotilátek. Klinicky významná aloprotilátka anti-K je diagnostikována u cca 0,1 % žen (v ČR ročně cca 100 žen). Plod je však ohrožen rozvojem HDFN pouze v případě, že má na povrchu erytrocytů přítomen komplementární antigen, jedná se o cca 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 minisekvance.

HDFN (Hemolytic disease of the fetus and newborn) - hemolytická nemoc plodu a novorozence).

Upraveno dle Holusková I. et al. [37], Durdová V. et al. [29]



Obrázek č. 19

Klinický význam stanovení alely *KEL2*, která odpovídá přítomnosti erytrocytárního antigenu "k"

V České republice je u všech těhotných žen prováděn screening nepravidelných antierytrocytárních aloprotilátek, klinicky významná aloprotilátka anti-k je diagnostikována jen u cca 0,01 % žen (v ČR ročně 10 žen) a komplementární antigen je přítomen u většiny plodů, u cca 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.

HDFN (Hemolytic disease of the fetus and newborn) - hemolytická nemoc plodu a novorozence).

Upraveno dle Holusková I. et al. [37], Durdová V. et al. [29]

5 CÍLE PRÁCE

Zjistit efektivitu stanovení *KEL* genotypu plodu u aloimunizovaných žen minisekvenací.

Zjistit efektivitu stanovení *RHCE* genotypu plodu u aloimunizovaných žen minisekvenací.

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

Stanovení genotypu plodu bylo provedeno v 7. – 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 bukálním stěrem u novorozence (tabulka č. 1).

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	30,0	
medián	30	
BMI (kg/m ²)	17-36	
průměr	24,3	
medián	23	
Rasa	kavkazská	

Tabulka č. 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.

Stanovení *KEL* a *RHCE* genotypu bylo prováděno na Ústavu lékařské genetiky Fakultní nemocnice Olomouc (Mgr. Böhmová J., doc. Vodička R.). Metodika pomocí minisekvence byla vyvinuta, validována a detailně popsána [6]. Pro stanovení *RHCE* genotypu byla adaptována výše uvedená metodika.

6.1 Odběr vzorku a laboratorní zpracování

Od každé těhotné ženy byla odebrána krev do dvou 9 ml zkumavek s EDTA (kyselina etylendiamintetraoctová). Nesrážlivá krev je ihned po odběru umístěna na led a max. do 4 hodin po odběru zpracována. Plazma je oddělena od buněčné frakce krve dvojitou centrifugací. První centrifugace je provedena při 2700 g 10 min, poté je provedena separace plazmy a následná recentrifugace 20 min při 3500 g v centrifuze IEC Multi RF, Thermo IEC. Vzorky jsou do dalšího zpracování zamrazeny na -28 °C. Plazmatická DNA je izolována vždy ve dvou paralelních zkumavkách („A“ a „B“). Izolace DNA z 1 ml plazmy se provádí kitem QiaAmp DNA Mini Kit (Qiagen). Inkubační krok izolace je prováděn při 56 °C, eluční objem je 65 µl. Izolace maternální DNA z leukocytů periferní krve je prováděna automatickým izolátorem Qiacube (Qiagene) s využitím kitu QiaAmp DNA mini kit (Qiagene) podle instrukcí v manuálu. Kontrolní DNA z bukalního stěru novorozenců je extrahována pomocí QiaAmp DNA Mini Kit (Qiagen) podle instrukcí v manuálu.

6.2 Statistické zpracování

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

6.3 Stanovení *KEL* genotypu plodu

6.3.1 Minisekvence s využitím kapilární elektroforézy

Plazmatická DNA („A“ i „B“) je analyzována ve dvou paralelních reakcích. Pro *KEL1/KEL2* detekci a kvantifikaci je využíván SNaPshot systém (Applied Biosystems). První PCR amplifikace je provedena s využitím primerů převzatých od Poole a kol. [77], původně navržených pro Real Time PCR. Sekvence PCR primerů jsou forward GGAGGCTGGCGCATCTC a reverse GCAGGATGAGGTCCTA. PCR směs pro DNA izolovanou z plazmy RHD těhotných žen o objemu 25 µl obsahuje 12,5 µl Combi PPP Master Mix (Top-Bio), 0,5 µl forward primeru (10pmol) - Sigma-Aldrich, 0,5 µl reverse primeru (10pmol) - Sigma-Aldrich a 11,5 µl DNA. PCR směs pro DNA izolovanou z leukocytů periferní krve těhotných žen a pro kontrolní DNA z bukálního stěru novorozenců o objemu 12,5 µl obsahuje 6,25 µl Combi PPP Master Mix (Top-Bio), 5,25 µl of PCR vody (Top-Bio), 0,25 µl forward primeru (10pmol) - Sigma-Aldrich, 0,25 µl reverse primeru (10pmol) - Sigma-Aldrich a 1 µl DNA [6].

Jako kontroly amplifikace a kontaminace jsou použity vzorky DNA izolované z RHD pozitivní krve, RHD pozitivní fetální DNA izolované z plazmy a PCR voda pro kontrolu kontaminace PCR reakčních mixů. PCR podmínky jsou 95 °C 10 min (95 °C 30 s, 59,5 °C 1 min, 72 °C 1 min) 35x, 72 °C 10 min. PCR amplifikace byla provedena pro všechny vzorky v termocykleru C 1000 (BIO-RAD). Enzymatické přečištění PCR produktů je prováděno pomocí exonukleázy I (Exonuclease - Thermo Scientific, Fermentas) a alkalické fosfatázy (Termo Scientific FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase - Thermo Scientific, Fermentas) podle manuálu. Minisekvenační reakce je prováděna s využitím SBE (single base extension) primeru: 24T-TGGTAAATGGACTTCCTTAACTTTAACCGAA12. Amplifikace byla provedena s využitím ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit (Applied Biosystems). Amplifikační směs pro DNA izolovanou z plazmy těhotných žen o objemu 8 µl obsahuje 4 µl SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mixu, 1 µl SBE primeru (10pmol) - Sigma-Aldrich, a 3,5 µl přečištěného PCR produktu. SNaPshot směs pro DNA izolovanou z leukocytů periferní krve RHD negativních těhotných žen a pro kontrolní DNA z bukálního stěru novorozenců o objemu 8 µl obsahuje 4 µl SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mixu, 0,5 µl SBE primeru (10pmol) - Sigma-Aldrich, 1,5 µl PCR vody (Top-Bio) a 2 µl přečištěného PCR produktu. Přečištění sekvenačních PCR produktů bylo provedeno enzymaticky alkalickou fosfatázou Thermo Scientific FastAP Thermosensitive Alkaline

Phosphatase (Termo Scientific, Fermentas) podle protokolu ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit (Applied Biosystems). Intenzita fluorescence a délka PCR produktů je určována pomocí kapilární elektroforézy na genetickém analyzátoru ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems) s využitím polymeru NanoPOP-7 (MC LAB - Applied Biosystems). Separace probíhala ve 36 cm dlouhé kapiláře o průměru 50 μm . Jeden μl PCR produktu je smíchán s 8,5 μl Hi-Di formamidu (Applied Biosystems) a velikostním standardem 0.5 μl GeneScan-120 LIZ Size Standard (Applied Biosystems). Každý vzorek plazmatické DNA je hodnocen při dvou podmínkách kapilární elektroforézy. První jsou nasátí vzorku při 1,2 kV po dobu 5 s, vlastní elektroforéza probíhá při 60 °C při napětí 15 kV a po dobu 20 min. Druhé jsou nasátí vzorku při 1,2 kV po dobu 16 s, vlastní elektroforéza probíhá při 60 °C při napětí 15 kV a po dobu 20 min. Podmínky kapilární elektroforézy pro DNA izolovanou z leukocytů periferní krve RHD negativních těhotných žen a pro kontrolní DNA z bukálního stěru novorozenců jsou nasátí vzorku při 1,2 kV po dobu 5 s, vlastní elektroforéza probíhá při 60 °C při napětí 15 kV a po dobu 20 min.

Ke snímání a digitalizaci hrubých dat fluorescence je používán software ABI PRISM 310 Data Collection. K vlastní analýze snímaných dat je využíván software GeneMapper v 4.1. (Applied Biosystems). Ke kvantitativním analýzám je použit parametr RFU (relativní fluorescenční jednotka) vyjádřený výškou píku pro *KEL1* a poměr RFU píků pro *KEL1* a *KEL2* [6].

6.4 Stanovení *RHCE* genotypu plodu

6.4.1 Minisekvenace s využitím kapilární elektroforézy

Pro stanovení genotypu *RHCE* byla adaptována výše uvedená metodika. Konkrétně byly použité primery pro RHC/c (rs676785, G>A): forward CCAGCCACCATCCCAATACC; reverse TGTGCAGTGGGCAATCCTG; SBE 16T-GATGACCACCTTCCCAG, a pro RHE/e (rs609320, G>C): forward TGGCATTCTTCCTTTGGATTGG; reverse CTCAGACCTTTGGAGCAGGAGT; SBE 24T-GGACTTCTCAGCAGAG.

7 VÝSLEDKY

KEL genotyp plodu byl stanoven u 327 žen, bylo vyloučeno 16 heterozygotních žen (*KEL1/KEL2*). Bylo vyšetřeno 311 homozygotních žen (*KEL2/KEL2*), ve 2 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 novorozence. 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 č. 1).

RHCE genotyp plodu byl stanoven u 39 žen.

U 22 žen bylo provedeno stanovení přítomnosti varianty genu *RHCE*, která odpovídá přítomnosti erytrocytárního antigenu “C”/“c”. Bylo vyloučeno 5 heterozygotních žen (*C/c*). U 11 homozygotních žen (*C/C*) byla stanovena přítomnost varianty genu *RHCE* plodu, která odpovídá přítomnosti erytrocytárního antigenu “c” minisekvenací 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” minisekvenací 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 č. 2 a 3).

U 17 žen bylo provedeno stanovení přítomnosti varianty genu *RHCE*, která odpovídá přítomnosti erytrocytárního antigenu “E”/“e”. Byla vyloučena 1 heterozygotní žena (*E/e*). U 16 homozygotních žen (*e/e*) byla stanovena přítomnost varianty genu *RHCE* plodu, která odpovídá přítomnosti erytrocytárního antigenu “E”/“e” minisekvenací 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 č. 4).

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 plod	<i>K/k</i>	13	0	13
	<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 č. 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**. Aloprotilátku **anti-K** si může vytvořit pouze *KEL1* negativní žena (genotyp *k/k*) po kontaktu s *KEL1* pozitivními erytrocyty (krevní transfúze, 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 novorozence z bukalního stěru. *KEL* genotyp ženy/plodu/novorozence byl stanoven minisekvencí. Celkem se podařilo získat 309 „tripletů“ (*KEL* genotyp ženy/plodu/novorozence).

CI (confidence interval) – interval spolehlivosti

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

Statistika	%	95% CI (%)
Senzitivita	100,00	59,04 - 100,00
Specificita	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 č. 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 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 transfúze, 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 „tripleťů“ (*RHCE* genotyp ženy/plodu/novorozence).

CI (confidence interval) – interval spolehlivosti

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 č. 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 transfúze, 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

stanoven <i>RHCE</i> genotyp u těhotných žen (n)	39
stanovena varianta genu <i>RHCE</i> odpovídající antigenu "E"	17
vyloučeny 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 novorozenec		
		E/e	e/e	celkem
genotyp	E/e	4	0	4
plod	e/e	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 č. 4

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

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

8 DISKUSE

Je-li u těhotné ženy zjištěna klinicky významné antierytrocytární aloprotilátka, je plod a novorozenec ohrožen rozvojem HDFN pouze v případě, že má na svých erytrocytech přítomen komplementární antigen [11]. 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 (cca 500 ročně) lze sledovat neinvazivně pomocí ultrazvukové dopplerometrie, stanovením MCA-PSV. Kordocentéza by měla být provedena pouze v indikovaných případech [52].

Mezi klinicky nejvýznamnější aloprotilátky patří i **anti-E, anti-K, anti-C, anti-c, anti-e a anti-k**. Seřazeno dle incidence [37]. V České republice je u aloimunizovaných žen dostupné stanovení **RHD** a **RHCE** genotypu plodu pomocí Real time PCR [38-40]. 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 transfúze, fetomaternální hemoragie). Může však vznikat i přirozeně bez erytrocytárního antigenního podnětu, takto vzniklá protilátka není aloprotilátkou a je otázkou, zda vůbec může způsobit rozvoj HDFN [43]. Incidence aloprotilátky anti-E u těhotných žen je 5,7 % [37]. V ČR se jedná ročně o cca 600 žen. Jedná se o nejčastěji diagnostikovanou aloprotilátku [66, 73, 87]. Incidence antigenu "E" je u bělošské populace cca 30 % [20, 60]. "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" [43] (Obrázek č. 12). 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 erytrocyty (krevní transfúze, fetomaternální hemoragie) [8]. Aloprotilátka

anti-K může způsobovat závažnou formu HDFN [64]. Závažnost HDFN lze jen obtížně předpovědět, protože korelace mezi hladinou aloprotilátky a stupněm fetální anémie je jen velmi malá [99]. Kromě hemolýzy inkompatibilních erytrocytů může způsobovat i útlum krvetvorby jejich prekurzorů v kostní dřeni [20]. Incidence aloprotilátky anti-K u těhotných žen je cca 1,2 ‰ [37]. V ČR se jedná ročně o cca 100 žen. Incidence antigenu “K” je u bělošské populace cca 10 % [60]. “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 5 ohrožených plodů ročně. Stanovením *KEL* genotypu plodu, dokážeme vyloučit až 95 % plodů (95 plodů ročně), u kterých není přítomna alela *KEL1* odpovídající přítomnosti erytrocytárního antigenu “K” [29] (Obrázek č. 17). 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 erytrocyty (krevní transfúze, fetomaternální hemoragie) [43]. Incidence aloprotilátky anti-C u těhotných žen je 1,2 ‰ [37, 80]. V ČR se jedná ročně o cca 100 žen. Incidence antigenu “C” je u bělošské populace cca 68 % [62]. 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” [43] (Obrázek č. 11).

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 nekorrespondují 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 erytrocyty (krevní transfúze, fetomaternální hemoragie) [43]. Jde o klinicky významnou aloprotilátku, která je schopna způsobit závažnou formu HDFN. Velmi často jde o opožděnou hemolýzu. Její hemolytický potenciál je velmi podobný aloprotilátce anti-D [34, 105]. Incidence aloprotilátky anti-c u těhotných žen je 0,8 -1,0 ‰ [37, 80]. V ČR ročně se jedná o cca 100 žen. Incidence antigenu “c” je u bělošské populace cca 80 % [62], “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“ [43] (Obrázek č. 11). 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 [43]). Incidence aloprotilátky anti-e u těhotných žen je cca 0,2 ‰ [37, 80]. V ČR se jedná ročně o cca 20 žen. Komplementární antigen je přítomen u většiny plodů, u cca 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 (Obrázek č. 12).

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 (Celano, KEL2) u těhotných žen je cca 0,1 ‰ [37, 80]. V ČR se jedná ročně o cca 10 žen. Komplementární antigen je přítomen u většiny plodů, u cca 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 (Obrázek č. 17).

9 ZÁVĚR

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

Minisekvenace s využitím kapilární elektroforézy umožnila spolehlivou detekci *RHCE* genotypu plodu z periferní krve těhotné ženy. Výsledky jsou však ovlivněny malým vzorkem pacientek.

Klinický význam má stanovení genotypu plodu u aloimunizovaných žen s přítomnou antierytrocytární aloprotilátkou *anti-E, anti-K, anti-C a anti-c*.

LITERATURA (citace uvedeny dle normy ČSN ISO 690)

1. **ACOG Practice Bulletin No. 192 Summary:** Management of Alloimmunization During Pregnancy. *Obstetrics and gynecology*. 2018; 131: 611-612.
2. **Ahaded A**, Brossard Y, Debbia M, et al. Quantitative determination of anti-K (KEL1) IgG and IgG subclasses in the serum of severely alloimmunized pregnant women by ELISA. *Transfusion*. 2000; 40: 1239-1245.
3. **American College of Obstetrics and Gynecologists.** ACOG Practice Bulletin No. 75: Management of alloimmunization during pregnancy. *Obstetrics and gynecology*. 2006; 108: 457-464.
4. **Babinszki A**, Lapinski, R. H., Berkowitz, R. L. . Prognostic factors and management in pregnancies complicated with severe kell alloimmunization: experiences of the last 13 years. *Am J Perinatol*. 1998; 15: p. 695-701.
5. **Bartha JL**, Illanes, S., Abdel-Fattah, S. A. et al. . Comparison of different reference values of fetal blood flow velocity in the middle cerebral artery for predicting fetal anemia. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2005; 25: p. 335-340.
6. **Bohmova J**, Vodicka R, Lubusky M, et al. Clinical Potential of Effective Noninvasive Exclusion of KEL1-Positive Fetuses in KEL1-Negative Pregnant Women. *Fetal diagnosis and therapy*. 2016; 40: 48-53.
7. **Bohmova J**, Vodicka R, Lubusky M, et al. RHD genotyping from cell-free fetal DNA circulating in pregnant women peripheral blood and sensitivity assessment of innovated diagnostic approaches for introduction into the clinical practice. *Ceska gynekologie*. 2013; 78: 32-40.
8. **Bowell P**, Brown, SE., Dike, AE., Inskip, MJ. . The significance of anti-c alloimmunization in pregnancy. *British journal of obstetrics and gynaecology*. 1986; 93: 1044-1048.
9. **Bowman J**, Harman C, Manning F, et al. Erythroblastosis fetalis produced by anti-k. *Vox sanguinis*. 1989; 56: p 187-189.
10. **Bowman J**, Pollock, JM. . Maternal Cw alloimmunization. *Vox sanguinis*. 1993; 63: 226-230.
11. **British Committee for Standards in Haematology**, Milkins C, Berryman J, et al. Guidelines for pre-transfusion compatibility procedures in blood transfusion laboratories. *British Committee for Standards in Haematology. Transfusion medicine*. 2013; 23: 3-35.
12. **British Committee for Standards in Haematology Blood Transfusion Task F**, Gooch A, Parker J, et al. Guideline for blood grouping and antibody testing in pregnancy. *Transfusion medicine*. 2007; 17: 252-262.

13. **Bullock R**, Martin WL, Coomarasamy A, et al. Prediction of fetal anemia in pregnancies with red-cell alloimmunization: comparison of middle cerebral artery peak systolic velocity and amniotic fluid OD450. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2005; 25: 331-334.
14. **Caine ME**, Mueller-Heubach, E. . Kell sensitization in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1986; 154: p. 85-90.
15. **Calda P**. Příčiny, prevence a diagnostika aloimunizace v těhotenství. *Actual Gyn*. 2009: 55 - 60.
16. **Calhoun DA**. Postnatal diagnosis and management of hemolytic disease of the fetus and newborn, www.uptodate.com2018.
17. **Clark D**, Greiss MA and Urbaniak SJ. A prospective study of routine antenatal enzyme antibody screening demonstrates lack of clinical value in predicting haemolytic disease of the newborn. *British journal of haematology*. 1999; 106: 824-826.
18. **Collinet P**, Subtil D, Puech F, et al. Successful treatment of extremely severe fetal anemia due to Kell alloimmunization. *Obstetrics and gynecology*. 2002; 100: 1102-1105.
19. **Daniels G**. Human blood groups. Blackwell Publishing, 2002.
20. **Daniels GB**, I. Essential Guide to Blood Groups 1th edition, Oxford 2007.
21. **De Silva M**. New guidelines for pre and perinatal immunohaematology. Istanbul. 2003: 109-111.
22. **Dean L**. Blood groups and Red Cell Antigens. National Center for Biotechnology Information (US), NCBI. 2005.
23. **Deren O**, Onderoglu, L. . The value of middle cerebral artery systolic velocity for initial and subsequent management in fetal anemia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2002; 101: p. 26-30.
24. **Deti L**, Mari, G., Akiyama, M. et al. . Longitudinal assessment of the middle cerebral artery peak systolic velocity in healthy fetuses and in fetuses at risk for anemia. *Am J Obstet Gynecol*. 2002; 187: p. 937-939.
25. **Deti L**, Oz, U., Guney, I. et al. Doppler ultrasound velocimetry for timing the second intrauterine transfusion in fetuses with anemia from red cell alloimmunization. Collaborative Group for Doppler Assesment of the Blood Velocity in Anemic Fetuses. . *Am J Obstet Gynecol*. 2001; 185: p. 1048-1051.
26. **Dort J**, Tobrmanová, H. Hyperbilirubinémie novorozence, Doporučený postup <http://www.neonatology.cz/upload/www.neonatology.cz/Legislativa/Postupy/hyperbilirubinemie.pdf>.

27. **Duguid J and Bromilow I.** Haemolytic disease of the newborn due to anti-k. *Vox sanguinis.* 1990; 58: p. 69.
28. **Dukler D,** Oepkes, D., Seaward, G. et al. . Noninvasive tests to predict fetal anemia: A study comparing Doppler and ultrasound parameters. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 188: p. 1310-1314
29. **Durdová V,** Holusková I and Kratochvílová Tea. Klinický význam neinvazivního stanovení *KEL* genotypu plodu v managementu těhotenství s rizikem rozvoje hemolytické nemoci plodu a novorozence. *Postgraduální medicína.* 2016; 18: s. 358-361.
30. **El Bouhmedi A,** Boulot, P., Laffargue, F., Brun, J. F. Rheological properties of fetal red cells with special refence to aggregability and disaggregability analyzed by light transmission and laser backscattering techniques. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2000; 22: p. 79-90.
31. **Fan FC,** Chen, R. Y. Z., Schuessler, G. B. et al. . Effects of hematocrit variations on regional hemodynamics and oxygen transport in the the dog. *Am J Physiol.* 1984; 238: p. 545-552.
32. **Garner SF,** Gorick BD, Lai WY, et al. Prediction of the severity of haemolytic disease of the newborn. Quantitative IgG anti-D subclass determinations explain the correlation with functional assay results. *Vox sanguinis.* 1995; 68: 169-176.
33. **Geifman-Holtzman O,** Wojtowycz M, Kosmas E, et al. Female alloimmunization with antibodies known to cause hemolytic disease. *Obstetrics and gynecology.* 1997; 89: 272-275.
34. **Hackney DN,** Knudtson EJ, Rossi KQ, et al. Management of pregnancies complicated by anti-c isoimmunization. *Obstetrics and gynecology.* 2004; 103: 24-30.
35. **Hadley AG,** Kumpel BM, Leader KA, et al. Correlation of serological, quantitative and cell-mediated functional assays of maternal alloantibodies with the severity of haemolytic disease of the newborn. *British journal of haematology.* 1991; 77: 221-228.
36. **Holuskova I,** Lubusky M, Studnickova M, et al. Erythrocyte alloimmunization in pregnant women, clinical importance and laboratory diagnostics. *Ceska gynekologie.* 2013; 78: 89-99.
37. **Holuskova I,** Lubusky M, Studnickova M, et al. Incidence of erythrocyte alloimmunization in pregnant women in olomouc region. *Ceska gynekologie.* 2013; 78: 56-61.
38. **Hromadnikova I,** Vechetova L, Vesela K, et al. Non-invasive fetal RHD exon 7 and exon 10 genotyping using real-time PCR testing of fetal DNA in maternal plasma. *Fetal diagnosis and therapy.* 2005; 20: 275-280.
39. **Hromadnikova I,** Vechetova L, Vesela K, et al. Non-invasive fetal RHD and RHCE genotyping using real-time PCR testing of maternal plasma in RhD-negative

- pregnancies. The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society. 2005; 53: 301-305.
40. **Hromadnikova I**, Vesela K, Benesova B, et al. Non-invasive fetal RHD and RHCE genotyping from maternal plasma in alloimmunized pregnancies. Prenatal diagnosis. 2005; 25: 1079-1083.
 41. **Joy S**, Rossi, KQ., Krugh, D., OShaughnessy, RW. Management of pregnancies complicated by anti-E alloimmunization. Obstet gynecol 2005; 105: 24-28.
 42. **Judd WJ**, Luban NL, Ness PM, et al. Prenatal and perinatal immunohematology: recommendations for serologic management of the fetus, newborn infant, and obstetric patient. Transfusion. 1990; 30: 175-183.
 43. **Kratochvilova T.**, Durdova V., Strasilova P., Lubusky M. Klinický význam neinvazivního stanovení *RHD* a *RHCE* genotypu plodu v managementu těhotenství s rizikem rozvoje hemolytické nemoci plodu a novorozence. Postgraduální medicína. 2016; 18: 362-369.
 44. **Kulich V** and Kohout M. Hemolytic disease of a newborn caused by anti-k antibody. Ces Pediatr. 1967; 22: p. 823-826.
 45. **Levine P**, Backer M, Wigod M, et al. A new human hereditary blood property (Cellano) present in 99.8% of all bloods. Science. 1949; 109: p. 464-466.
 46. **Lubusky M**. The importance of irregular red cell antibodies screening and blood group antigens assessment in pregnant women. Ceska gynekologie. 2015; 80: 236-238.
 47. **Lubusky M**, Prochazka M, Santavy J, et al. Actual management of pregnancies at risk for fetal anemia. Ceska gynekologie. 2006; 71: 272-280.
 48. **Lubusky M**, Prochazka M, Simetka O, et al. Guideline for prevention of RhD alloimmunization in RhD negative women. Ceska gynekologie. 2013; 78: 132-133.
 49. **Lubusky M**, Simetka O, Studnickova M, et al. Fetomaternal haemorrhage in delivery by cesarean section. Ceska gynekologie. 2012; 77: 156-162.
 50. **Lubusky M**, Studnickova, M. Fetomaternální hemoragie. Postgraduální medicína, FOCUS. 2012; 14: 282-289.
 51. **Lubušký M**, Procházka, M. Erytrocytární aloimmunizace těhotných žen: Hemolytická nemoc plodu a novorozence. Postgraduální medicína. 2012; 16: s 242-246.
 52. **Lubušký M**, Procházka M., Hálek J., Klásková E. Management těhotenství s rizikem rozvoje hemolytické nemoci plodu a novorozence. Postgraduální medicína 2016; 18: 352-357.
 53. **Lubušký M.**, Procházka M., Hálek J., Klásková E. Management těhotenství s rizikem rozvoje hemolytické nemoci plodu a novorozence - doporučený postup Ceska gynekologie. 2017; 1.

54. **MacGregor SN SR**, Sholl JS. Enhanced sensitization after cordocentesis in a rhesus-isoimmunized pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1991; 165: 382-383.
55. **Mari G**, Deter, RL., Carpenter, RL., et al. Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. Collaborative Group for Doppler Assessment of the Blood Velocity in Anemic Fetuses. *New Engl J Med*. 2000; 342: p 9-14.
56. **Mari G**, Detti, L., Oz, U. et al. . Accurate prediction of fetal hemoglobin by Doppler ultrasonography. *Obstet Gynecol*. 2002; 99: p. 589-593.
57. **Mari G**, Penso, C., Sbracia, M. et al. . Delta OD450 and Doppler velocimetry of the middle cerebral artery peak velocity in the evaluation for fetal alloimmune hemolytic disease: Which is best? . *Am J Obstet Gynecol*. 1997; 177: p. 18.
58. **Mari G**, Rahman F, Olofsson P, et al. Increase of fetal hematocrit decreases the middle cerebral artery peak systolic velocity in pregnancies complicated by rhesus alloimmunization. *The Journal of maternal-fetal medicine*. 1997; 6: 206-208.
59. **Mari G**, Zimmermann, R., Moise, K. J., Deter, R. L. . Correlation between middle cerebral artery peak systolic velocity and fetal hemoglobin after 2 previous intrauterine transfusions. . *Am J Obstet Gynecol*. 2005; 193: p. 1117-1120.
60. **Masopust J.**, Písačka M. *Praktická imunohematologie, Erytrocyty* 2016.
61. **Masopust J. BH**, Dušková D., Pejchalová A., Písačka M., Štolba P. . Prenatální a postnatální imunohematologická vyšetření. *Transfuze a hematologie dnes*. 2008; 14: s 7-18.
62. **Masopust J. PM**. *Praktická imunohematologie, Erytrocyty* 1ed. 2016.
63. **Masopust J. PM**, Turek P. Základní imunohematologická laboratorní vyšetření červené řady, Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP. 2019; 4.
64. **McKenna D**, Nagaraja H and O'Shaughnessy R. Management of pregnancies complicated by anti-Kell isoimmunization. *Obstetrics and gynecology*. 1999; 93: p. 667-673.
65. **McLean LK**, Hedriana, H. L., Lanouette, J. M., Haesslein, H. C. A retrospective review of isoimmunized pregnancies managed by middle cerebral artery peak systolic velocity. *Am J Obstet Gynecol*. 2004; 190: p. 1732-1738.
66. **Moinuddin I**, Fletcher C and 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: 283-289.
67. **Moise K**. Kell aloimunizace matky může vést k rozvoji anémie plodu. *Gynekologie po promoci*. 2009: s. 24-31.

68. **Nicolaides KH, Rizzo, G., Hecher, K.** . Placental and fetal Doppler. Doppler studies in red blood cell isoimmunization. Parthenon Publishing Group. 2000: p. 105-119.
69. **Nishie EN, Brizot, M. L., Liao, A. W. et al.** Comparison between middle cerebral artery peak systolic velocity and amniotic fluid optical density at 450 nm in the prediction of fetal anemia. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 188: p. 214-219.
70. **Oepkes D, Seaward PG, Vandenbussche FP, et al.** Doppler ultrasonography versus amniocentesis to predict fetal anemia. *The New England journal of medicine.* 2006; 355: 156-164.
71. **Oepkes D, Seaward, G., Vandenbussche, F. et al.** Minimally invasive management of Rh Alloimmunization: Can Amniotic fluid delta OD450 be replaced by Doppler studies. *Am J Obstet Gynecol.* 2004; 191: p. 2.
72. **Ozolek JA, Watchko JF and Mimouni F.** Prevalence and lack of clinical significance of blood group incompatibility in mothers with blood type A or B. *The Journal of pediatrics.* 1994; 125: 87-91.
73. **Pal M and Williams B.** Prevalence of maternal red cell alloimmunisation: a population study from Queensland, Australia. *Pathology.* 2015; 47: 151-155.
74. **Palomaki G, Kloza E and Lambert-Messerlian G, et al.** DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet Med.* 2011; 13: p. 913–920.
75. **Penka M, Tesařová, E.** . Hematologie a transfuzní lékařství II. 2012.
76. **Pereira L, Jenkins TM and Berghella V.** Conventional management of maternal red cell alloimmunization compared with management by Doppler assessment of middle cerebral artery peak systolic velocity. *American journal of obstetrics and gynecology.* 2003; 189: 1002-1006.
77. **Poole J, N. W, Hustinx H, et al.** A KEL gene encoding serine at position 193 of the Kell glycoprotein results in expression of KEL1 antigen. *Transfusion.* 2006; 46: p. 1879–1885.
78. **Queenan J, Smith B and Haber J, et. al.** Irregular antibodies in the obstetric patient. *Obstetrics and gynecology.* 1969; 34: p. 767 - 771.
79. **Rahman F DL, Ozcan T, Khan R, Manohar S, Mari G.** Can a single measurement of amniotic fluid delta optical density be safely used in the clinical management of rhesus-alloimmunized pregnancies before 27 weeks' gestation? *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica.* 1998; 77: 804-807.
80. **Reid M, Lomas - Francis, C.** The blood group antigen facts Book. 2nd ed ed. New York 2004.
81. **Ross ME WP, Cashore WJ, de Alarcon PA.** Hemolytic disease of the fetus and newborn In: *Neonatal Hematology: Pathogenesis, Diagnosis, and Management of Hematologic Problems.* Cambridge University Press, Cambridge, 2013.

82. **Řeháček V**, MJ, et al. Transfuzní lékařství. 2013.
83. **Scheier M**, Hernandez-Andrade, E., Carmo, A. et al. . Prediction of fetal anemia in rhesus disease by measurement of fetal middle cerebral artery peak systolic velocity. *Ultrasound Obstet Gynecol.*, 2004; 23: p. 432-436.
84. **Simetka O**, Petros M, Lubusky M, et al. Changes in middle cerebral artery velocimetry of fetuses diagnosed postnatally with mild or moderate hemolytic disease. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*. 2014; 93: 1059-1064.
85. **Slootweg YM**, Lindenburg IT, Koelewijn JM, et al. Predicting anti-Kell-mediated hemolytic disease of the fetus and newborn: diagnostic accuracy of laboratory management. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2018; 219: 393 e391-393 e398.
86. **Smart EA** and Storry JR. The OK blood group system: a review. *Immunohematology*. 2010; 26: 124-126.
87. **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: 127-130.
88. **Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM)** Clinical Guideline: the fetus at risk for anemia-diagnosis and management. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2015; 212: 697-710.
89. **Southcott J**, Tanner J and Anstee D. The expression of human blood group antigens during erythropoiesis in a cell culture system. *Blood*. 1999; 93: 4425-4435.
90. **Spitzer Alan R**. Intensive Care of the Fetus and Neonate 2nd edition ed. Mosby E.
91. **Stanworth S**, Fleetwood P and de Silva M. Severe haemolytic disease of the newborn due to anti-Js(b). *Vox sanguinis*. 2001; 81: 134-135.
92. **Stefos T**, Cosmi, E., Detti, L., Mari, G. . Correction of fetal anemia on the middle cerebral artery peak systolic velocity. *Obstet Gynecol*. 2002; 99: p. 211-215.
93. **Studnickova M**, Holuskova I, Durdova V, et al. Spontaneous antepartal RhD alloimmunization. *Ceska gynekologie*. 2015; 80: 401-404.
94. **Teixeira JMA**, Duncan, K., Letsky, E., Fisk, N. M. Middle cerebral artery peak systolic velocity in the prediction of fetal anemia. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2000; 15: p. 205-208.
95. **Trevett T**, Moise, KJ. . Twin pregnancy complicated by severe hemolytic disease of the fetus and newborn due to anti-g and anti-C. *Obstetrics and gynecology*. 2005; 106: p. 1178-1180.

96. **Unzeitig V**, Měchurová, A., Lubušký, M., Velebil, P., Dvořák, V. . Zásady dispenzární péče ve fyziologickém těhotenství - doporučený postup ČGPS ČLS JEP. Ceska gynekologie. 2015; 80: 456-458.
97. **Van Dongen H**, Klumper, F. J. C. M., Sikkel, E. et al. . Non-invasive tests to predict fetal anemia in Kell-alloimmunized pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2005; 25: p. 341-345.
98. **Van Kamp I**, Klumper, FJ., Bakkum, RS., et al. . The severity of immune fetal hydrops is predictive of fetal outcome after intrauterine treatment. *American journal of obstetrics and gynecology.* 2001; 185: p. 668-673.
99. **van Wamelen DJ**, Klumper FJ, de Haas M, et al. Obstetric history and antibody titer in estimating severity of Kell alloimmunization in pregnancy. *Obstetrics and gynecology.* 2007; 109: 1093-1098.
100. **Vaughan JI**, Manning M, Warwick RM, et al. Inhibition of erythroid progenitor cells by anti-Kell antibodies in fetal alloimmune anemia. *The New England journal of medicine.* 1998; 338: 798-803.
101. **Vaughan JI WR**, Letsky EA, et al. . Erythropoietic suppression in fetal anemia because of Kell alloimmunisation. *American journal of obstetrics and gynecology.* 1994; 171: p 247–252.
102. **Vignoni E**, Daldoss, C., Soregaroli, M., et al. . Monitoring of pregnancy complicated by maternal-fetal isoimmunization: a comparison between 2 clinical procols. *Minerva Gynecol.* 2003; 55: p. 353-358.
103. **Wagner T**, Resch B and Reiterer Fea. Pancytopenia due to suppressed hematopoesis in a case of fetal hemolytic disease of the newborn associated with anti-K supported by molecular K1 typing. . *Journal of pediatric hematology/oncology.* 2004; 26: 13-15.
104. **Welch R**, Rampling, M. W., Anwar, A. et al. Changes in hemorheology with fetal intravascular transfusion. *Am J Obstet Gynecol.* 1994; 170: p. 726-732.
105. **Wenk RE**, Goldstein P and Felix JK. Alloimmunization by hr'(c), hemolytic disease of newborns, and perinatal management. *Obstetrics and gynecology.* 1986; 67: 623-626.
106. **Whittle MJ**. Rhesus haemolytic disease. *Archives of disease in childhood.* 1992; 67: 65-68.
107. **WJ J**. Practice guidelines for prenatal and perinatal immunohematology. *Transfusion.* 2001; 41: p. 1445–1452.
108. **Zimmerman R**, Carpenter RJ, Durig P, et al. Longitudinal measurement of peak systolic velocity in the fetal middle cerebral artery for monitoring pregnancies complicated by red cell alloimmunisation: a prospective multicentre trial with intention-to-treat. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology.* 2002; 109: 746-752.

10 VĚDECKO – VÝZKUMNÁ ČINNOST AUTORA

10.1 Práce související s disertační prací

10.1.1 Původní vědecké publikace v daném oboru v časopise s IF

Bohmova J., Vodicka R., Lubusky M., Holuskova I., Studnickova M., Kratochvilova R., Krejcirikova M., Janikova M., **Durdova V.**, Kratochvilova T., Filipova H., Dusek L., Dhaifalah I., Vomackova K., Kacerovsky M., Vrtel R. **Clinical potential of effective non-invasive exclusion of *KELI* positive fetuses in *KELI* negative pregnant women.** Fetal Diagn. Ther., 2016, 40 (1), p. 48-53. (IF-2,699)

10.1.2 Původní vědecké publikace uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

Durdová V., Böhmová J., Kratochvílová T., Vodička R., Holusková I., Langová K., Lubušký, M., **Efektivita stanovení *KEL* a *RHCE* genotypu plodu u aloimunizovaných žen minisekvenací,** Česká gynekologie 2020, 85, č. 3, s. 164-173.

Kratochvílová T., Böhmová J., **Durdová V.**, Vodička R., Holusková I., Langová K., Lubušký, M., **Screening *RhD* genotypu plodu u *RhD* negativních žen,** Česká gynekologie 2020, 85, č. 3, s. 156-163.

Studničková M., Holusková I., **Durdová V.**, Kratochvílová T., Strašilová P., Marková I., Lubušký M., **Spontánní antepartální *RhD* aloimunizace,** Česká gynekologie, 2015, 80, č 6, s. 401-404.

10.1.3 Přehledné/souborné vědecké práce uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

Durdová V., Holusková I., Kratochvílová T., Strašilová P., Lubušký M., **Klinický význam neinvazivního stanovení *KEL* genotypu plodu v managementu těhotenství**

s rizikem rozvoje hemolytické nemoci plodu a novorozence, Postgraduální medicína 2016, ročník 18 (4), s. 358-361.

Kratochvílová T., Holusková I., **Durdová V.**, Stražilová P., Ľubušký M. **Klinický význam neinvazivního stanovení RHD a RHCE genotypu plodu v managementu těhotenství s rizikem rozvoje hemolytické nemoci plodu a novorozence.** Postgrad. Med. 2016, 18 (4), s. 362-369.

10.1.4 Publikovaná abstrakta

Durdová V., Doležalová V., Studničková M., Holusková I., Ľubušký M. **Klinický význam vyšetření KEL genotypu plodu z periferní krve těhotné ženy.** Moravská konference fetomaternální medicíny, Olomouc, 7. 11. 2014, poster. ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

Durdová V., Bohmová J., Doležalová V., Studničková M., Holusková I., Ľubušký M. **Stanovení KEL genotypu plodu z volné fetální DNA v periferní krvi těhotné ženy.** Moravská konference fetomaternální medicíny, Olomouc, 7. 11. 2014, poster. ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

Studničková M., Holusková I., **Durdová V.**, Doležalová T., Ľubušký M. **Spontánní antepartální RhD aloimunizace.** Moravská konference fetomaternální medicíny, Olomouc, 7. 11. 2014, poster. ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

Durdová V., Bohmová J., Kratochvílová T., Studničková M., Holusková I., Ľubušký M. **Stanovení KEL genotypu plodu z volné fetální DNA v periferní krvi těhotné ženy.** 32. celostátní konference PERINATOLOGIE A FETOMATERNÁLNÍ MEDICÍNY s mezinárodní účastí, Liberec, 17. - 18. 4. 2015, poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt str. 14, ISBN 978-80-87562-33-8)

Studničková M., Holusková I., **Durdová V.**, Kratochvílová T. Ľubušký M. **Incidence specifických klinicky významných antierytrocytárních aloprotilátek u žen v I. trimestru těhotenství.** 32. celostátní konference PERINATOLOGIE A

FETOMATERNÁLNÍ MEDICÍNY s mezinárodní účastí, Liberec, 17. - 18. 4. 2015, poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt str. 25, ISBN 978-80-87562-33-8)

Studníčková M., Holusková I., **Durdová V.**, Kratochvílová T., Lubušký M. **Screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek u žen v I. trimestru těhotenství.** 32. celostátní konference PERINATOLOGIE A FETOMATERNÁLNÍ MEDICÍNY s mezinárodní účastí, Liberec, 17. - 18. 4. 2015, poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt str. 26, ISBN 978-80-87562-33-8)

Studnickova M., **Durdova V.**, Kratochvilova T., Markova I., Strasilova P., Horvathova K., Pilka R., Lubusky M. **Spontaneous antepartal RhD alloimmunization.** 14th World Congress in Fetal Medicine, Crete, Greece, 21. - 25. 6. 2015, poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt CD)

Durdova V., Kratochvilova T., Studnickova M., Markova I., Strasilova P., Horvathova K., Pilka R., Lubusky M. **Effective and clinically applicable non-invasive assessment of *KELI* positive fetuses in *KELI* negative "K" alloimmunized pregnant women.** 14th World Congress in Fetal Medicine, Crete, Greece, 21. - 25. 6. 2015, poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt CD)

Durdová V., Bohmová J., Kratochvílová T., Studníčková M., Holusková I., Lubušký M. **Neinvazivní stanovení *KELI* pozitivního plodu u *KELI* negativní „K“ aloimunizované těhotné ženy.** Moravská konference fetomaternální medicíny, Olomouc, 6. 11. 2015, poster. ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

Durdová V., Holusková I., Kratochvílová T., Lubušký M. **Efektivita stanovení RHD genotypu plodu a objemu FMH v managementu prevence RhD aloimunizace.** 34. celostátní konference PERINATOLOGIE A FETOMATERNÁLNÍ MEDICÍNY s mezinárodní účastí, Karlovy Vary, 6. - 8. 4. 2017, poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt s. 19)

Kratochvílová T., **Durdová V.**, Holusková I., Lubušký M. **Klinický management těhotenství s rizikem rozvoje HDFN ve FNOL v letech 2002-2016.** 34. celostátní

konference PERINATOLOGIE A FETOMATERNÁLNÍ MEDICÍNY s mezinárodní účastí, Karlovy Vary, 6. - 8. 4. 2017, poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt s. 24)

Maděrková Tozzi M., Kratochvílová T., **Durdová V.**, Ľubušký M. Management těhotenství s rizikem rozvoje RhD aloimunizace u těhotné ženy - kazuistiky. **Moravská konference fetomaternální medicíny**, Olomouc, 10. 11. 2017, poster. ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

Sobková K., Kratochvílová T., **Durdová V.**, Ľubušký M. **Management těhotenství s rizikem rozvoje závažné formy hemolytické nemoci plodu a novorozence – kazuistiky.** Moravská konference fetomaternální medicíny, Olomouc, 10. 11. 2017, poster. ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

Durdová V., Bohmová J., Kratochvílová T., Holusková I., Ľubušký M. **Stanovení KEL a RHCE genotypu plodu u aloimunizovaných těhotných žen.** 35. celostátní konference PERINATOLOGIE A FETOMATERNÁLNÍ MEDICÍNY s mezinárodní účastí, Mikulov, 12 - 14. 4. 2018, poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt s. 26-27)

Kratochvílová T., **Durdová V.**, Holusková I., Ľubušký M. **Screening RHD genotypu plodu u RhD negativních žen.** 35. celostátní konference PERINATOLOGIE A FETOMATERNÁLNÍ MEDICÍNY s mezinárodní účastí, Mikulov, 12. - 14. 4. 2018, poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt s. 31)

Kratochvilova T., **Durdova V.**, Bohmova J., Holuskova I., Ľubušký M. **Screening of RHD fetal genotype in RhD negative women.** 17th World Congress in Fetal Medicine, Athens, Greece, 24. - 28. 6. 2018, poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt CD)

Durdova V., Bohmova J., Kratochvilova T., Vodicka R., Ľubušký M., **Assessment of KEL and RHCE fetal genotype in alloimmunized women.** 17th World Congress in Fetal Medicine, Athens, Greece, 24. - 28. 6. 2018, poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt CD)

Durdová V., Bohmova J., Kratochvilova T., Vodicka R., Ľubušký M. Assessment of the fetal *KEL* and *RHCE* genotype in alloimmunized pregnant women. Moravská konference fetomaternální medicíny, Olomouc, 9. 11. 2018, poster. ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

Kratochvílová T., **Durdová V., Bohmová J., Holusková I., Ľubušký M. Screening *RHD* genotypu plodu u RhD negativních žen.** Moravská konference fetomaternální medicíny, Olomouc, 9. 11. 2018, poster. ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

10.1.5 Seznam přednášek/posterů přednesených uchazečem na veřejných odborných fórech

Durdová V., Kratochvílová T., Holusková I., Bohmová J. Ľubušký M., Klinický význam stanovení *KEL* genotypu plodu z periferní krve těhotné ženy, Brno, 1. Společná konference ČGPS ČLS JEP a SGPS SLS (6. 6. – 8. 6. 2014), poster

Durdová V., Kratochvílová T., Holusková I., Bohmová J. Ľubušký M., Determination of the fetal *KEL* genotype from the cell-free fetal DNA in the peripheral blood of the mother, 13. Světový kongres fetální medicíny, Nice, Francie, 29. 6. – 3. 7. 2014, poster

Durdová V., Kratochvílová T., Holusková I., Bohmová J. Ľubušký M. Neinvazivní stanovení *KEL1* pozitivního plodu u *KEL1* negativní “K“ aloimunizované těhotné ženy, 36. Celostátní konferenci sekce ultrazvukové diagnostiky v Brně, 2. – 4. 10. 2015, přednáška

Durdová V., Kratochvílová T., Ľubušký M. Management těhotenství s rizikem rozvoje hemolytické nemoci plodu a novorozence, Odborné sympozium Fetální medicíny, v Praze v Žižkovské věži, 5. 9. 2016, přednáška

Durdová V., Kratochvílová T., Ľubušký M. Klinický význam stanovení fetomaternální hemoragie při nitroděložním úmrtí plodu, 37. Celostátní konferenci sekce ultrazvukové diagnostiky v Brně 7. – 9. 10. 2016, přednáška

Durdová V. Stanovení *KEL* a *RHCE* genotypu plodu u aloimunizovaných žen, 40. Celostátní konferenci sekce ultrazvukové diagnostiky v Brně 27. – 29. 9. 2019, přednáška

10.2 Ostatní publikace

10.2.1 Původní vědecké publikace v daném oboru v časopise s IF

Capkova P., Santava A., Markova I., Stefekova A., Srovnal J., Staffova K., Durdova V., **Haploinsufficiency of BMP4 and OTX2 in the Foetus with an abnormal facial profile detected in the first trimester of pregnancy**, Molecular cytogenetics, 2017/12/01, 10.1186/s13039-017-0351-3. (IF-1,12)

10.2.2 Přehledné/souborné vědecké práce uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

Strašilová P., **Durdová V.**, Kratochvílová T., Lubušký M. **Infekce parvovirem B19 v těhotenství**. Postgrad. Med. 2016, 18 (4), s. 370-374.

Strašilová P., **Durdová V.**, Kratochvílová T., Lubušký M. **Farmakologické ukončení těhotenství v I. trimestru**. Postgrad. Med. 2016, 18 (4), s. 381-390.

Bubeníková Š., Cíhová A., Roubalová L., **Durdová V.**, Vlk R., **Využití poměru koncentrací solubilního receptoru tyrozinkinázového typu 1 a placentárního růstového faktoru pro krátkodobou predikci a diagnostiku preeklampsie**, Česká gynekologie, 2016, 84, č 4, s. 272-278.

10.2.3 Publikovaná abstrakta

Marková I., **Durdová V.**, Kratochvílová T., Studničková M., Šopíková B., Geierová M., Ľubušký M. **Dynamický prenatální vývoj artrogrypózy plodu v ultrazvukovém obraze.** 32. celostátní konference PERINATOLOGIE A FETOMATERNÁLNÍ MEDICÍNY s mezinárodní účastí, Liberec, 17. - 18. 4. 2015, přednáška. ABSTRAKT (Sborník abstrakt str. 8, ISBN 978-80-87562-33-8)

Kratochvílová T., Marková I., **Durdová V.**, Ľubušký M. **Management těhotenství s atypickou vrozenou vadou urotraktu u plodu.** 32. celostátní konference PERINATOLOGIE A FETOMATERNÁLNÍ MEDICÍNY s mezinárodní účastí, Liberec, 17-18. 4. 2015, přednáška. ABSTRAKT (Sborník abstrakt str. 12, ISBN 978-80-87562-33-8)

Durdová V., Kratochvílová T., Marková I., Studničková M., Šopíková B., Geierová M., Ľubušký M. **Atypický nález nervové tkáně v dutině břišní u plodu s Downovým syndromem.** 32. celostátní konference PERINATOLOGIE A FETOMATERNÁLNÍ MEDICÍNY s mezinárodní účastí, Liberec, 17- 18. 4. 2015, poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt str. 14, ISBN 978-80-87562-33-8)

Strasilova P., **Durdova V.**, Kratochvilova T., Markova I., Studnickova M., Horvathova K., Pilka R., Lubusky M. **The diagnosis of systemic disease of pregnant women based on ultrasound finding in fetus.** 14th World Congress in Fetal Medicine, Crete, Greece, 21. - 25. 6. 2015, poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt CD)

Markova I., **Durdova V.**, Kratochvilova T., Studnickova M., Strasilova P., Horvathova K., Pilka R., Lubusky M. **Redislocation of central nervous tissue of the fetus in induced medical abortion in the second trimester of pregnancy.** 14th World Congress in Fetal Medicine, Crete, Greece, 21 - 25. 6. 2015, poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt CD)

Markova I., Lubusky M., Strasilova P., **Durdova V.**, Kratochvilova T., Studnickova M., Horvathova K. **Very early-onset severe fetal growth restriction with an extremely poor prognosis - what is the right management?** 4th International Conference on Fetal Growth, Spain, Barcelona, 14. - 16. 9. 2015, poster. ABSTRACT (Collection of abstracts)

Durdová V., Marková I., Šopíková B., Geierová M., Kratochvílová T., Studničková M., Lubušský M. **Atypický nálezný centrální nervové tkáně u plodů po indukovaném potratu.** Moravská konference fetomaternální medicíny, Olomouc, 6. 11. 2015, poster. ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

Kratochvílová T., Marková I., **Durdová V.**, Lubušský M., **Management těhotenství s atypickou vrozenou vadou urotraktu plodu.** Moravská konference fetomaternální medicíny, Olomouc, 6. 11. 2015, poster. ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

Markova I., Strasilova P., **Durdova V.**, Kratochvilova T., Studnickova M., Horvathova K., Lubusky M. **Very Early-onset severe Fetal Growth Restriction with an extremely poor prognosis – What is the right management?** Moravská konference fetomaternální medicíny, Olomouc, 6. 11. 2015, poster. ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

Strašilová P., Klásková E., **Durdová V.**, Dubrava L., Kratochvílová T., Marková I., Studničková M., Horváthová K., Lubušský M. **Srdeční vada plodu jako první příznak systémového onemocnění těhotné ženy.** Moravská konference fetomaternální medicíny, Olomouc, 6. 11. 2015, poster. ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

Durdová V., Horváthová K., Šantavá A., Čapková P., Adamová K., Marková I., Kratochvílová T., Strašilová P., Studničková M., Lubušský M. **Diagnostika vzácné chromosomální abnormality na základě atypického profilu obličeje plodu v I. trimestru těhotenství.** 33. celostátní konference PERINATOLOGIE A FETOMATERNÁLNÍ MEDICÍNY s mezinárodní účastí, Ústí nad Labem, 7. - 9. 4. 2016, přednáška. ABSTRAKT (Sborník abstrakt na CD)

Kratochvílová T., Marková I., **Durdová V.**, Studničková M., Ľubušký M. **Variabilita klinických projevů Di Georgova syndromu.** 33. celostátní konference PERINATOLOGIE A FETOMATERNÁLNÍ MEDICÍNY s mezinárodní účastí, Ústí nad Labem, 7. - 9. 4. 2016, přednáška. ABSTRAKT (Sborník abstrakt na CD)

Durdová V., Marková I., Kratochvílová T., Sobek A., Holusková I., Ľubušký M. **Klinický význam stanovení fetomaternální hemoragie při nitroděložním úmrtí plodu.** Moravská konference fetomaternální medicíny, Olomouc, 11. 11. 2016, poster. ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

Hostinská E., **Durdová V.**, Horváthová K., Šantavá A., Čapková P., Adamová K., Marková I., Kratochvílová T., Slunská P., Studničková M., Ľubušký M. **Diagnostika vzácné chromosomální abnormality na základě atypického profilu obličeje plodu v I. trimestru těhotenství.** Moravská konference fetomaternální medicíny, Olomouc, 11. 11. 2016, poster. ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

Kratochvílová T., Marková I., **Durdová V.**, Ľubušký M. **Variabilita klinických projevů u Di Georgova syndromu.** Moravská konference fetomaternální medicíny, Olomouc, 11. 11. 2016, poster. ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

Slunská P., **Durdová V.**, Kratochvílová T., Hostinská E., Sobek A., Marková I., Ľubušký M. **Abnormální nález v oblasti CNS ve III. trimestru - prognosa a management?** Moravská konference fetomaternální medicíny, Olomouc, 11. 11. 2016, poster. ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

Slunská P., Maderková Tozzi M., **Durdová V.**, Kratochvílová T., Hostinská E., Ľubušký M. **Medical termination of pregnancy up until the 7th week of gestation in the Czech Republic: the role of ultrasound in diagnosis and follow up.** 16th World Congress in Fetal Medicine, Ljubljana, Slovenia, 25. - 29. 6. 2017, poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt CD)

Durdová V., Kratochvílová T., Roubalová L., Pilka R., Ľubušký M. **Combined screening for preeclampsia at 11–13 weeks.** 16th World Congress in Fetal Medicine, Ljubljana, Slovenia, 25. - 29. 6. 2017, poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt CD)

Kratochvilova T., **Durdova V.**, Roubalova L., Pilka R., Lubusky M. **Combined screening for small for gestational age at 11–13 weeks.** 16th World Congress in Fetal Medicine, Ljubljana, Slovenia, 25. - 29. 6. 2017, poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt CD)

Lubusky M., **Durdova V.**, Kratochvilova T., Roubalova L. **Screening for preeclampsia using sFlt-1/PlGF ratio cut-off of 38 at 27-37 weeks gestation.** 16th World Congress in Fetal Medicine, Ljubljana, Slovenia, 25. - 29. 6. 2017, poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt CD)

Roubalova L., **Durdova V.**, Kratochvilova T., Lubusky M. **Comparison of two test systems for sFlt-1, PlGF and the sFlt-1/PlGF ratio assessment.** 16th World Congress in Fetal Medicine, Ljubljana, Slovenia, 25. - 29. 6. 2017, poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt CD)

Slunska P., Maderkova Tozzi M., **Durdova V.**, Kratochvilova T., Hostinska E., Lubusky M. **Medical termination of pregnancy up until the 7th week of gestation in the Czech Republic: the role of ultrasound in diagnosis and follow up.** 27th World Congress on Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, Vienna, Austria, 16. - 19. 9. 2017, poster. ABSTRACT (Ultrasound Obstet. Gynecol., 2017, 50 (Suppl. 1), p. 369, ISSN 0960-7692)

Lubusky M., Kratochvilova T., **Durdova V.**, Hostinska E., Slunska P., Roubalova L. **Combined screening for small for gestational age at 11–13 weeks.** 6th International Conference on Fetal Growth, Cork, Ireland, 20. - 22. 9. 2017, Oral poster. ABSTRACT (Collection of abstracts)

Durdova V., Kratochvilova T., Roubalova L., Lubusky M. Combined screening for preeclampsia at 11–13 weeks. **Moravská konference fetomaternální medicíny**, Olomouc, 10. 11. 2017, poster. ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

Hostinska E., **Durdova V.**, Kratochvilova T., Roubalova L., Lubusky M. Screening for preeclampsia using sFlt-1/PlGF ratio cut-off of 38 at 27-37 weeks gestation. Moravská

konference fetomaternální medicíny, Olomouc, 10. 11. 2017, poster. ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

Kratochvilova T., **Durdova V.**, Roubalova L., Lubusky M. **Combined screening for small for gestational age at 11–13 weeks.** Moravská konference fetomaternální medicíny, Olomouc, 10. 11. 2017, poster. ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

Roubalova L., **Durdova V.**, Kratochvilova T., Lubusky M. **Comparison of two test systems for sFlt-1, PlGF and the sFlt-1/PlGF ratio assessment.** Moravská konference fetomaternální medicíny, Olomouc, 10. 11. 2017, poster. ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

Roubalova L., Lubušký M., **Durdova V.**, Kratochvilova T., Langova K. **The evolution of the levels of PlGF, sFlt-1 and the sFlt-1/PlGF ratio during pregnancy in the group of women without and with preeclampsia.** 17th World Congress in Fetal Medicine, Athens, Greece, 24. - 28. 6. 2018, poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt CD)

Roubalova L., Langova K., Kroutilova V., **Durdova V.**, Kratochvilova T., Lubušký M. **Maternal serum levels of PlGF and sFlt-1 in predicting delivery of an SGA newborn.** 7th International Conference on Fetal Growth, Milan, Italy, 1. - 3. 10. 2018, Lecture. ABSTRACT (Collection of abstracts p. 38)

10.2.4 Seznam přednášek/posterů přednesených uchazečem na veřejných odborných fórech

Durdová V., Kratochvílová T., Marková I., Ľubušký M. Atypický nález centrální nervové tkáně u plodů po indukovaném abortu, Celostátní konferenci sekce ultrazvukové diagnostiky, Brno, 2. – 4. 10. 2015, přednáška

Durdová V., Kratochvílová T., Roubalová L., Ľubušký M. Prenatální péče o těhotenství s rizikem rozvoje preeklampsie a růstové restrikce plodu. Přednáškový večer spolků lékařů Olomouc, 13. 4. 2016, přednáška

Durdová V., Kratochvílová T., Ľubušký M. Ne-optimální management vícečetného těhotenství, Celostátní konference sekce ultrazvukové diagnostiky, Brno, 5 - 7. 10. 2018, přednáška

Durdová V. Vícečetné těhotenství, hotel Flora, Semínář 120 let porodnice v Olomouci 19. 3. 2019, přednáška

11 GRANTY

Podané žádosti o udělení účelové podpory MZ ČR v roce 2017

Možnosti využití současných a nových biochemických markerů při screeningu a predikci preeklampsie v III. trimestru u neselektované populace těhotných žen pro bezprostřední zavedení do rutinní klinické praxe.

Návrh projektu NV18-02-00273.

Projekt nebyl přijat.

Podané žádosti o udělení účelové podpory MZ ČR v roce 2018

Stanovení cut-off hodnot poměru sFlt-1/PlGF pro vyloučení preeklampsie během druhého a třetího trimestru těhotenství a cut – off hodnot poměru sFlt-1/PlGF pro predikci porodu pro preeklampsii do 1 týdne u neselektované populace těhotných žen.

Návrh projektu NV19-02-00241.

Projekt nebyl přijat.

12 SOUHRN

CÍL STUDIE

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

TYP STUDIE

Prospektivní kohortová studie

NÁZEV A SÍDLO PRACOVISŤE

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

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

U 17 žen byla stanovena varianta genu *RHCE*, která odpovídá přítomnosti erytrocytárního antigenu “E“/“e“. Byla vyloučena 1 heterozygotní žena (*E/e*). U 16 homozygotních žen (*e/e*) byla stanoven *RHCE* genotypu u plodu. U 75 % (12/16) plodů i novorozenců byl stanoven genotyp *e/e*, u 25 % (4/16) genotyp *E/e*. **Senzitivita i specificita 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

13 SUMMARY

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

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

14 PŘÍLOHY

Příloha číslo 1

Bohmová J., Vodicka R., Lubusky M., Holusková I., Studnicková M., Kratochvílová R., Krejčířiková M., Janiková M., **Durdová V.**, Kratochvílová T., Filipová H., Dusek L., Dhaifalah I., Vomacková K., Kacerovsky M., Vrtel R. **Clinical potential of effective non-invasive exclusion of *KELI* positive fetuses in *KELI* negative pregnant women.** Fetal Diagn. Ther., 2016, 40 (1), p. 48-53, (IF-2,699).

Příloha číslo 2

Durdová V., Böhmová J., Kratochvílová T., Vodička R., Holusková I., Langová K., Ľubušký, M., **Efektivita stanovení *KEL* a *RHCE* genotypu plodu u aloimunizovaných žen minisekvenací, Česká gynekologie 2020, 85, č. 3, s. 164-173.**

Příloha číslo 3

Durdová V., Holusková I., Kratochvílová T., Stražilová P., Ľubušký M., **Klinický význam neinvazivního stanovení *KEL* genotypu plodu v managementu těhotenství s rizikem rozvoje hemolytické nemoci plodu a novorozence,** Postgraduální medicína 2016, ročník 18 (4), s. 358-361.

Příloha číslo 4

Kratochvílová T., Böhmová J., **Durdová V.**, Vodička R., Holusková I., Langová K., Ľubušký, M., **Screening *RhD* genotypu plodu u *RhD* negativních žen, Česká gynekologie 2020, 85, č. 3, s. 156-163.**

Příloha číslo 5

Kratochvílová T., Holusková I., **Durdová V.**, Stražilová P., Ľubušký M. **Klinický význam neinvazivního stanovení *RHD* a *RHCE* genotypu plodu v managementu těhotenství s rizikem rozvoje hemolytické nemoci plodu a novorozence.** Postgrad. Med. 2016, 18 (4), s. 362-369.

Příloha číslo 6

Studničková M., Holusková I., **Durdová V.**, Kratochvílová T., Strašilová P., Marková I., Lubušký M., **Spontánní antepartální RhD aloimunizace**, Česká gynekologie, 2015, 80, č 6, s. 401-404.

Příloha číslo 7

Podaná žádost o udělení účelové podpory MZ ČR v roce 2017

Možnosti využití současných a nových biochemických markerů při screeningu a predikci preeklampsie v III. trimestru u neselektované populace těhotných žen pro bezprostřední zavedení do rutinní klinické praxe. Návrh projektu NV18-02-00273.

Příloha číslo 8

Podaná žádost o udělení účelové podpory MZ ČR v roce 2018

Stanovení cut-off hodnot poměru sFlt-1/PlGF pro vyloučení preeklampsie během druhého a třetího trimestru těhotenství a cut – off hodnot poměru sFlt-1/PlGF pro predikci porodu pro preeklampsii do 1 týdne u neselektované populace těhotných žen. Návrh projektu NV19-02-00241.