

Screening *RHD* genotypu plodu u RhD negativních žen

Screening of *RHD* fetal genotype in RhD negative women

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

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

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

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

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

ABSTRACT

Objective: In the Czech Republic in all women within a first trimester screening a laboratory testing for RhD blood group from the peripheral blood should be performed. The aim of the screening is to diagnose RhD negative pregnant women, who may be at risk of developing RhD alloimmunization if the fetus is RhD positive. Currently, the prevention of RhD alloimmunization is carried out regardless of the knowledge of *RHD* fetal status. Already at the beginning of pregnancy it is possible to determine the *RHD* genotype of the fetus non-invasively due to cell free fetal DNA circulating in maternal peripheral blood detection. The issue of screening examination of fetal *RHD* genotype is solved worldwide. In some European countries, the examination is routinely established and thus contributes to the optimization of prenatal care for RhD negative pregnant women, immunoglobulin administration is targeted only in pregnancies with RhD positive fetus.

The aim of our study is to evaluate clinical and laboratory effectiveness of fetal *RHD* genotype screening in RhD negative women by TaqMan Real-time PCR method.

Design: Prospective cohort study.

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

Material and methods: In 2011–2015 at the University Hospital Olomouc 337 examinations of *RHD* fetal genotype were performed in pregnant women in first and second trimester and evaluated by TaqMan Real-time PCR, followed by verification of the newborn *RHD* genotype.

Results: Methodology of fetal *RHD* genotype examination is accurate, reliable and useful in clinical practice. The sensitivity was 97.8%. The specificity was 98.7%. When assessing the effectiveness of the introduction of non-invasive fetal *RHD* genotype screening in RhD negative women, it is necessary to assess the medical, organizational and economic aspects. More consistent prevention of RhD alloimmunization in the cases actually indicated may reduce the incidence of RhD alloimmunization.

Conclusion: From the medical point of view the *RHD* genotype determination in all RhD negative women at the beginning of pregnancy seems effective. It allows to diagnose about 40% of pregnancies with RhD negative fetuses that do not require administration of IgG anti-D. IgG anti-D should be administered only in indicated cases. Determination of fetal *RHD* genotype by using TaqMan Real-time PCR is useful in clinical practice.

KEYWORDS

pregnancy, RhD negative women, cell free fetal DNA, TaqMan Real-time polymerase chain reaction, fetal *RHD* genotype, prevention of RhD alloimmunization, immunoglobulin (Ig) G anti-D

SOUHRN

Úvod: V České republice se stanovuje na začátku těhotenství RhD krevní skupina, cílem screeningu je diagnostikovat RhD negativní těhotné ženy, které mohou být ohroženy rozvojem RhD aloimunizace, to nastává pouze v případě, že plod je RhD pozitivní. V současné době se prevence RhD aloimunizace provádí bez ohledu na znalost *RHD* statutu plodu. Již na začátku těhoten-

ství je možné stanovit *RHD* genotyp plodu neinvazivně z volné fetální DNA cirkulující v mateřské periferní krvi. Problematika screeningového vyšetření *RHD* genotypu plodu je celosvětově řešena. V některých evropských zemích je vyšetření již rutinně zavedeno, a přispívá tak k optimalizaci prenatální péče o RhD negativní těhotné, aplikace imunoglobulinu je cílená pouze u těhotenství s RhD pozitivním plodem.

Cílem naší práce je zhodnotit klinickou a laboratorní efektivitu screeningu *RHD* genotypu plodu u RhD negativních žen metodou TaqMan Real-time PCR.

Typ studie: Prospektivní kohortová studie.

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

Materiál a metodika: V letech 2011–2015 ve Fakultní nemocnici Olomouc bylo provedeno 337 vyšetření *RHD* genotypu plodu u těhotných žen v I. a II. trimestru a hodnoceno pomocí TaqMan Real-time PCR. Výsledek byl poté ověřen na *RHD* genotypu novorozence.

Výsledky: Metodika vyšetření *RHD* genotypu plodu je přesná, spolehlivá a využitelná v klinické praxi. Senzitivita byla 97,8 %, specifická byla 98,7 %. Při hodnocení efektivitu zavedení neinvazivního screeningu *RHD* genotypu plodu u RhD negativních žen je nutné

současně hodnotit hledisko medicínské, organizační i ekonomické. Důslednější provádění prevence RhD aloimunizace ve skutečně indikovaných případech může vést ke snížení incidence RhD aloimunizace.

Záv r: Z medicínského hlediska je stanovení *RHD* genotypu plodu u všech RhD negativních žen na začátku těhotenství jednoznačně efektivní. Umožní diagnostikovat přibližně 40 % RhD negativních plodů, kdy ženě není třeba podat IgG anti-D. Stanovení *RHD* genotypu plodu pomocí metodiky TaqMan Real-time PCR genotypu plodu je využitelné v klinické praxi.

KLÍČOVÁ SLOVA

t hotenství, RhD negativní žena, volná fetální DNA, TaqMan Real-time polymerázová et zová reakce, RHD genotyp plodu, prevence RhD aloimunizace, imunglobulin (Ig) G anti-D

MUDr. Tereza Kratochvilová: e-mail: terka.dolezalova@seznam.cz

Čes. Gynek., 2020, 85, č. 3, s. 156–163

ÚVOD

V České republice (ČR) se u všech těhotných žen v I. trimestru provádí stanovení krevní skupiny RhD. Cílem screeningu je diagnostikovat asi 15 % RhD negativních žen (v ČR ročně asi 15 000 žen), které mohou být v průběhu těhotenství a při porodu ohroženy rozvojem RhD aloimunizace [2]. Provádění prevence RhD aloimunizace u RhD negativních žen přehledně zobrazuje schéma 1 [15]. RhD negativní žena je však ohrožena rozvojem RhD aloimunizace pouze v případě, že plod má na povrchu svých erytrocytů přítomen antigen “D“ (je-li RhD pozitivní), jedná se přibližně o 10 % plodů (10 000 ročně). Přítomnost antigenu “D“ lze vyšetřit neinvazivně stanovením genotypu plodu z volné fetální DNA cirkulující v periferní krvi těhotné ženy. Znalost *RHD* genotypu plodu má klinický význam v prenatální péči o RhD negativní ženy, protože 40 % z nich bude mít RhD negativní plod a preventivní podání IgG anti-D by u nich nemělo být indikováno (schéma 2).

Možnosti stanovení *RHD* genotypu plodu jsou různé. Vyšetření genetického materiálu plodu získaného invazivním odběrem (odběr plodové vody, odběr choriových klků) se ke stanovení *RHD* genotypu plodu nevyužívají. Podle nově publikovaného systematického přehledu je sice riziko potratu velmi nízké, nicméně přetrvává zvýšené riziko rozvoje aloimunizace [21]. S objevem neinvazivního vyšetření volné fetální DNA v roce 1997 v plazmě těhotné ženy nastává nový trend na poli medicíny [14]. Již na začátku těhotenství je možné u RhD negativní ženy stanovit *RHD* genotyp plodu z volné fetální DNA cirkulující v mateřské periferní krvi.

Procentuální zastoupení volné fetální DNA v plazmě těhotných žen je velmi variabilní a pohybuje se nejčastěji v rozmezí 5–10 % v závislosti na délce těhotenství, velikosti placenty, hmotnosti ženy, rizikovém těhotenství atd. [7]. Díky takto nízké fetální frakci je nutné použít citlivou metodu, kterou je např. Real-time PCR (PCR, polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce). Problematika neinvazivního stanovení *RHD* genotypu plodu je řešena celosvětově. Incidence RhD inkompatibility se liší v závislosti na etnickém původu. Přibližně 15 % bělošské populace je RhD negativní, tato vysoká incidence v populaci souvisí s rozšířením screeningu *RHD* genotypu plodu zejména v Evropě [5]. Dosud publikované práce v ČR byly jen na malém souboru pacientek [10, 25].

Cílem naší práce bylo zhodnotit klinickou a laboratorní efektivitu screeningu *RHD* genotypu plodu u RhD negativních žen metodou TaqMan Real-time PCR na rozsáhlém souboru pacientek.

MATERIÁL A METODIKA

V letech 2011–2015 ve Fakultní nemocnici Olomouc ve spolupráci Porodnicko-gynekologické kliniky, Ústavu lékařské genetiky a transfúzního oddělení bylo na rozsáhlém souboru RhD negativních žen provedeno neinvazivní stanovení *RHD* genotypu plodu z periferní krve a dále konfirmační vzorky bukalních stěrů novorozenců. Všechny RhD negativní těhotné byly nealoimunizované, kavkazské rasy, průměrný věk žen byl 29 let (nejmladší měla 18 let, nejstarší 40 let), 80 % vyšetření bylo v I. trimestru, medián 12. týden, 20 % vyšetření bylo

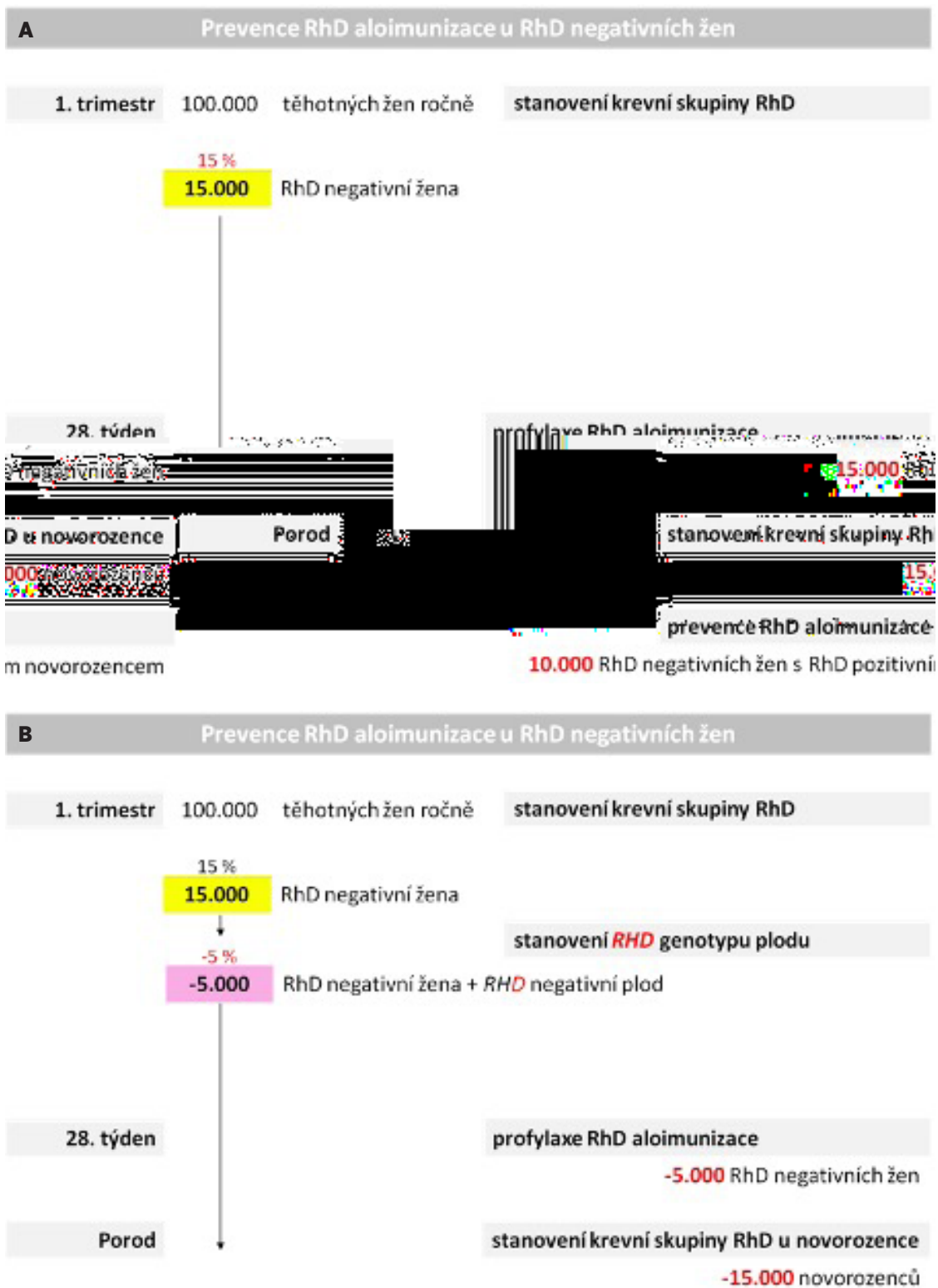


Schéma 2 Prevence RhD aloimunizace u RhD negativních žen při nejčastějších potenciálně senzibilizujících událostech v České republice

A. Předpokládaný počet indikací ročně k podání imunoglobulinu (Ig) G anti-D těhotné ženě a ke stanovení krevní skupiny RhD u novorozence, není-li na začátku těhotenství u všech RhD negativních žen stanoven *RHD* genotyp plodu.

B. Předpokládaný počet indikací ročně, kdy není nutné podat IgG anti-D těhotné ženě a kdy není nutné stanovit krevní skupinu RhD u novorozence, je-li na začátku těhotenství u všech RhD negativních žen stanoven *RHD* genotyp plodu.

Tab. 1 Charakteristiky sledovaného souboru těhotných žen. Celkem bylo vyšetřeno 337 RhD negativních těhotných žen v prvním nebo druhém trimestru těhotenství

RhD negativní ženy (n)	337	
	I. trimestr	II. trimestr
	271 (80 %)	66 (20 %)
Gestační stáří (týden)	7–13	14–23
medián	12	15
průměr	12,5	15,5
Věk (rok)	18–43	
medián	29	
průměr	30,0	
BMI (kg/m²)	17–36	
medián	23	
průměr	24,3	
Rasa	kavkazská	

ve II. trimestru, medián 15. týden. Charakteristiky sledovaného souboru těhotných žen přehledně zobrazuje tabulka 1.

Celkem bylo vyšetřeno 337 RhD negativních těhotných žen, DNA izolovaná z 1 ml plazmy periferní krve těhotné ženy byla izolována pomocí kitu QiaAmp DNA Mini Kit (Qiagen). RHD genotyp těhotné ženy byl stanoven z leukocytů v periferní žilní krvi a RHD genotyp plodu z volné fetální DNA v plazmě. RHD genotyp plodu byl následně ověřen stanovením RHD genotypu novorozence z bukalního stěru. Všechny analýzy (RHD genotyp ženy/plodu/novorozence) byly provedeny metodikou TaqMan Real Time PCR s vnitřní kontrolou amplifikace, která je založena na detekci exonu 7 RHD genu a pro vnitřní kontrolu amplifikace byla použita sekvence β -globinu [1].

Statistická analýza

Prediktivní síla proměnných byla kvantifikována na základě standardního souboru statistik: senzitivity, specifity, falešné positivity, falešné negativity a celkové přesnosti. Analýzy byly vypočteny pomocí SPSS 23.0.0.1 (IBM Corporation, 2015).

VÝSLEDKY

Celkem se podařilo získat k vyhodnocení 333 „tripletů“ (RHD genotyp ženy/plodu/novorozence). Analýza selhala u dvou plazmatických vzorků, pravděpodobně pro nízkou koncentraci volné

fetální DNA zřejmě následkem její degradace, intenzita signálu PCR u plodu nebyla detekovatelná. U dvou vzorků nebylo možné stanovit RHD genotyp plodu z důvodu opakovaného RHD pozitivního nálezu u maternální DNA. Při izolaci a manipulaci s volnou fetální DNA hrozí riziko její kontaminace RHD pozitivní exogenní DNA. Tato kontaminace by vzhledem k malému množství volné fetální DNA mohla být interpretována jako falešně pozitivní výsledek při stanovení RHD genotypu plodu. Avšak falešná pozitivita nepředstavuje zvýšené riziko rozvoje erytrocytární aloimunizace. Zvýšené riziko chybného klinického managementu představuje jen falešná negativita, která v našich výsledcích byla velmi nízká, pouze čtyři plody byly falešně označeny jako RHD pozitivní. Z tohoto důvodu je nutné používat sérii kontrol amplifikace a kontaminace.

Ná základě vyhodnocení základních statistických parametrů posuzujících prediktivní sílu lze metodu stanovení RHD genotypu vyhodnotit jako velmi přesnou, spolehlivou a využitelnou v klinické praxi.

Výsledky a parametry screeningového testu přehledně zobrazuje schéma 3.

DISKUSE

Při hodnocení efektivity zavedení screeningu RHD genotypu plodu u RhD negativních žen je nutné současně hodnotit hledisko medicínské, organizační i ekonomické.

Z medicínského hlediska je stanovení RHD genotypu plodu u všech RhD negativních žen na začátku těhotenství jednoznačně efektivní. Umožní tak diagnostikovat přibližně 40 % RHD negativních plodů, v ČR se jedná ročně asi o 5000 RhD negativních těhotných žen, kterým není nutné podávat IgG anti-D. IgG anti-D by mělo být podáno pouze v indikovaných případech, protože se vyrábí z plazmy senzibilizovaných dárců, objem produkce je tudíž limitován a občasné výpadky IgG anti-D na trhu mohou být příčinou, že prevence RhD aloimunizace není prováděna adekvátně, což může zvýšit incidenci aloimunizovaných žen. Důslednější provádění prevence RhD aloimunizace ve skutečně indikovaných případech může vést ke snížení incidence RhD aloimunizace a následně i ke snížení incidence hemolytické nemoci plodu a novorozence [18]. V souvislosti s aplikací tohoto krevního produktu se mohou objevit nežádoucí reakce, a ani přes důsledná opatření není vyloučeno riziko přenosu virových onemocnění. V 80. letech bylo v souvislosti s podáním imunoglobulinu nakaženo 704 žen virem hepatitidy C [12]. V současné době je plazma senzibilizovaných dárců vyšetřována na HBsAg, anti HIV a HCV protilátky,

RhD negativní ženy - fenotyp(n)	337
RHD negativní ženy - genotyp (n)	335
Selhala analýza volné fetální DNA (n)	2
Stanoven RHD genotyp plodu (n)	333
Stanoven RHD genotyp novorozence (n)	333

Plod	RHD +	Novorozenec		Celkem
		RHD +	RHD -	
	RHD +	179	2	181
	RHD -	4	148	152
Celkem		183	150	333

	%	95% CI (%)
Senzitivita	0,978	0,978
Specifická	0,987	0,987
Falešná pozitivita	0,013	0,013
Falešná negativita	0,022	0,022
Pozitivní prediktivní hodnota	0,989	0,989
Negativní prediktivní hodnota	0,974	0,974
Přesnost (shoda)	0,98	0,98
Koeficient shody (Cohenovo kappa)	0,96	0,96

Schéma 3 Stanovení RHD genotypu plodu u RhD negativních žen – výsledky a parametry screeningového testu

Celkem bylo vyšetřeno 337 RhD negativních těhotných žen, RHD genotyp těhotné ženy byl stanoven z leukocytů v periferní žilní krvi a RHD genotyp plodu z volné fetální DNA v plazmě. RHD genotyp plodu byl následně ověřen stanovením RHD genotypu novorozence z bukálního stěru. RHD genotyp ženy/plodu/novorozence byl stanoven metodikou TaqMan RealTime PCR. Celkem se podařilo získat 333 „tripleťů“ (RHD genotyp ženy/plodu/novorozence).

CI (confidence interval) – interval spolehlivosti

ale možný je i přenos nemocí, na které není dosud žádné testování (priony). Anafylaktická reakce se popisuje na 1:100 000 podání [19].

Rutkowski uvádí tři kazuistiky hypersenzitivity po podání imunoglobulinu a navrhuje vhodný management v péči o těhotné se známou hypersenzitivitou na imunoglobulin [20]. Podle SmPC (souhrn údajů o léčivém přípravku) registrovaných přípravků v ČR je doporučeno sledovat pacientku nejméně 20 minut po podání, může dojít k alergické reakci na IgG anti-D. Příznaky zahrnují kožní projevy, a to i generalizovaný exantém, tlak na hrudníku, dušnost, hypotenzi a anafylaxi [24]. Přípravky obsahují malé množství IgA. Jedinci s nedostatkem IgA mají potenciál ke vzniku IgA protilátek a anafylaktických reakcí po podání krevních složek obsahujících IgA. Vzácně může aplikace vyvolat pokles krevního tlaku s anafylaktickým šokem i u pacientek, které předchází léčbu lidským

imunoglobulinem snášely. Medicínský význam screeningového vyšetření RHD genotypu plodu je tedy nesporný.

V některých zemích je screeningové neinvazivní vyšetření RHD genotypu zavedeno do klinické praxe. Pouze RhD negativní matky RhD pozitivních plodů dostávají rutinní antenatální anti-D profylaxi. Jedná se o státy v Evropě, což souvisí s vysokou incidencí RhD negativních žen v populaci. Přehled zemí a publikovaných výsledků screeningu RHD genotypu plodu u RhD negativních žen v rámci strategie provádění prevence RhD aloimunizace zobrazuje tabulka 2.

V Dánsku a Nizozemsku je již screeningové neinvazivní vyšetření RHD genotypu plodu implementováno do klinické praxe. Vyšetření se provádí ve 27. týdnu těhotenství, v případě RhD pozitivního plodu není imunoglobulin G anti-D těhotné ženě podán [4, 8]. V Norsku bylo zavedeno neinvazivní

Tab. 2 Screening RHD genotypu plodu u RhD negativních žen

Přehled zemí a publikovaných výsledků screeningu RHD genotypu plodu u RhD negativní ženy v rámci strategie provádění prevence RhD aloimunizace.

Země	Studie	RhD negativní ženy			RHD genotyp plodu			
		(n)	Gestační stáří (týden)	medián	metodika	cff DNA RHD exon	DR (%)	FPR (%)
Dánsko	Clausen 2014	12668	NA	25	qPCR	5, 7, 10	99,9	1,7
Nizozemí	De Haas 2016	25789	27-29	27	qPCR	5,7	99,9	0,87
Norsko	Sørensen 2018	373	16-36	24	qPCR	7, 10	100	0,8
Finsko	Haimila 2017	10814	24-26	NA	qPCR	5,7	99,9	0,2
Velká Británie	Chitty 2014	3039	5-35	19	qPCR	5,7	99,3	0,9
	Soothill 2015	529	15-26	NA	qPCR	5,7	100	0,6
Švédsko	Wikman 2012	3652	3-40	10	qPCR	4	99,8	1,1
Itálie	Manfroi 2018	367	24-28	NA	Free DNA Fetal Kit*	5,7,10	100	2,5
		467	10-14	12			99,68	1,54
USA/Kanada	Moise 2016	458	15-24	18	SensiGEN RHD*	4,5,7	100	1,53
		433	26-32	28			100	0,82
Francie	Vivanti 2016	416	10-14	13	qPCR	10	100	4,8
Austrálie	Hyland 2017	665	9-37	19	qPCR	5,1	100	0,4
Belgie	Minon 2008	563	10-38	18	qPCR	4,5,10	100	0

cff DNA (cell free fetal DNA) – volná fetální DNA, DR (detection rate) – senzitivita, FPR (false positive rate) – falešná pozitivita, NA (not available) – údaj není dostupný, qPCR (quantitative polymerase chain reaction) – kvantitativní polymerázová řetězová reakce = RealTime PCR.

stanovení do rutinního používání od září 2016. Aby se snížil počet RhD aloimunizovaných, odběr se provádí ve 24. týdnu těhotenství, vyšetřuje se exon 7 a 10 [23]. Rutinní užití je i ve Finsku od roku 2014, kdy cílenou profylaxi dostávají pouze ženy nesoucí RhD pozitivní plod [9]. Ve Švédsku se od roku 2016 provádí screening již v prvním trimestru, což umožňuje dále i cílené použití imunoglobulinu G anti-D po invazivních výkonech v časném těhotenství a pozdních potratech [28]. V ostatních zemích Evropy, například Belgii, Irsku, Velké Británii, ČR, Francii a Německu, je dostupné prenatální vyšetření RHD genotypu jen v určitých regionech [3, 6, 16, 22, 27]. V USA je na trhu komerční vyšetření SensiGen RhD od firmy Sequenom [17]. V Kanadě byly v roce 2017 zahájeny kroky k implementaci screeningového vyšetření RHD genotypu [11]. V naší práci bylo 80 % vyšetření provedeno právě v I. trimestru. V zemích se zavedeným screeningem je, kromě Švédska, vyšetření prováděno až ve II. trimestru, vhodné je přesunout vyšetření do časného stadia těhotenství (I. trimestru), a využít tak znalost RHD genotypu plodu k optimální péči o RhD negativní těhotné, což potvrzují mnohé studie [9]. Podle mnohých populačních studií stanovení RHD genotypu plodu je spolehlivé, přesné a využitelné v klinické praxi, což je ve shodě s našimi výsledky. Z hlediska organizačního a ekonomického by mělo být vyšetření dostupné pro všechny RhD negativní těhotné ženy [18, 26].

ZÁVĚR

Trend screeningového stanovení RHD genotypu plodu v jednotlivých evropských zemích je zjevný, přispívá k optimalizaci prenatální péče o RhD negativní těhotné, aplikace IgG anti-D je cílená pouze u těhotenství s RhD pozitivním plodem a u 40 % těhotenství (plod RhD negativní) není těhotné ženě třeba podat IgG anti-D. Podle naší práce je stanovení RHD genotypu plodu s využitím exonu 7 pomocí TaqMan Real-time PCR přesné a využitelné v klinické praxi.

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

LITERATURA

1. **Böhmová, J., Vodička, R., Lubušský, M., et al.** Stanovení RHD genotypu plodu z plazmy periferní krve těhotné ženy a posouzení citlivosti nových diagnostických postupů pro zavedení do klinické praxe. *Čes Gynek*, 2013, 78(1), s. 32-40.
2. **ČGPS ČLS JEP.** Zásady dispenzární péče v těhotenství. Doporučený postup. 2019.
3. **Chitty, LS., Finning, K., Wade, A., et al.** Diagnostic accuracy of routine antenatal determination of fetal RHD status across gestation: population based cohort study. *BMJ*, 2014, 349, p. 5243-5243.
4. **Clausen, FB., Christiansen, M., Steffensen, R., et al.** Report of the first nationally implemented clinical routine screening

for fetal RHD in D-pregnant women to ascertain the requirement for antenatal RhD prophylaxis. *Transfusion*, 2012, 52, p. 752–758.

5. **Daniels, G., Bromilow, I.** Essential guide to blood group. Blackwell Publishing, 2009.

6. **Darlington, M., Carbonne, B., Mailloux, A., et al.** Effectiveness and costs of non-invasive foetal RHD genotyping in rhesus-D negative mothers: a French multicentric two-arm study of 850 women. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2018, 18, p. 496.

7. **Gregg, AR., Skotko, BG., Benkendorf, JL., et al.** Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med*, 2018, 18, p. 1056–1065.

8. **de Haas, M., Thurik, FF., van der Ploeg, CPB., et al.** Sensitivity of fetal RHD screening for safe guidance of targeted anti-D immunoglobulin prophylaxis: prospective cohort study of a nationwide programme in the Netherlands. *BMJ*, 2016, 355.

9. **Haimila, K., Sulin, K., Sainio, S., et al.** Targeted antenatal anti-D prophylaxis program for RhD-negative pregnant women – outcome of the first two years of a national program in Finland. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2017, 96, p. 1228–1233.

10. **Hromadnikova, I., Vechetova, L., Vlk, R., et al.** Non-invasive fetal RHD and RHCE genotyping using real-time PCR testing of maternal plasma in RhD-negative pregnancies. *J Histochem Cytochem*, 2005, 53, p. 301–305.

11. **Johnson, JA., MacDonald, K., Skoll, A., et al.** No. 343 Routine non-invasive prenatal prediction of fetal RHD genotype in Canada: The time is here. *J Obstet Gynaecol Canada*, 2017, 39, p. 366–373.

12. **Kenny-Walsh, E.** Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. *Irish Hepatology Research Group. N Engl J Med*, 1998, 340, p. 1228–1233.

13. **Kent, J., Farrell, AM., Soothill, P.** Routine administration of Anti-D: the ethical case for offering pregnant women fetal RHD genotyping and a review of policy and practice. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2014, 14, p. 87.

14. **Lo, D., Corbetta, N., Wainscoat, JS., et al.** Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, 1997, 350, p. 485–487.

15. **Lubušký, M., Procházka, M., Šimetka, O., Holusková I.** Doporučení k provádění prevence RhD aloimunizace u RhD negativních žen. Doporučený postup ČGPS ČLS JEP. *Čes Gynek*, 2013, 78(2), s. 132–133.

16. **Minon, JM., Gerard, C., Foidart, JM., et al.** Routine fetal RHD genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium. *Transfusion*, 2008, 48, p. 373–381.

17. **Moise, K., Gandhi, M., Paladino, T., et al.** Circulating cell-free DNA to determine the fetal RHD status in all three trimesters of pregnancy. *Obstet Gynecol*, 2016, 128, p. 1340–1346.

18. **Neovius, M., Tiblad, E., Wikman, A., et al.** Cost-effectiveness of first trimester non-invasive fetal RHD screening for targeted antenatal anti-D prophylaxis in RhD-negative pregnant women: a model-based analysis. *BJOG*, 2016, 12, p. 1337–1346.

19. **O'Brien, K., Siassakos, D., Bidgood, K., et al.** Reaction to anti-D immunoglobulin – can we manage it? *Obstet Med*, 2009, 2, p. 38–39.

20. **Rutkowski, K., Nasser, SM.** Management of hypersensitivity reactions to anti-D immunoglobulin preparations. *Allergy*, 2014, 69, p. 1560–1563.

21. **Salomon, LJ., Sotiriadis, A., Wulff, CB., et al.** Risk of miscarriage following amniocentesis or chorionic villus sampling: systematic review of literature and updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2019.

22. **Soothill, PW., Finning, K., Daniels, G., et al.** Use of cfDNA to avoid administration of anti-D to pregnant women when the fetus is RhD-negative: implementation in the NHS. *BJOG*, 2015, 122, p. 1682–1686.

23. **Sørensen, K., Kjeldsen-Kragh, J., Akkök, ÇA., et al.** Determination of fetal RHD type in plasma of RhD negative pregnant women. *Scand J Clin Laboratory Investigation*, 2018, 78, p. 411–416.

24. **Sulakvelidze, I., Evans, S., Dolovich, J., et al.** Urticaria from allergy to a purified human anti-Rh antibody preparation. *Allergy*, 1995, 50, p. 981–983.

25. **Svobodová, I., Pazourková E., Korabečná, M., et al.** Performance of Droplet Digital PCR in Non-Invasive Fetal RHD Genotyping – comparison with a Routine Real-Time PCR based approach. *PLOS One*, 2015, 10.

26. **Teitelbaum, L., Metcalfe, A., Johnson, JM., et al.** Costs and benefits of non-invasive fetal RhD determination. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2015, 45, p. 84–88.

27. **Vivanti, A., Benachi, A., Costa, JM., et al.** Diagnostic accuracy of fetal rhesus D genotyping using cell-free fetal DNA during the first trimester of pregnancy. *Amer J Obstet Gynecol*, 2016, 215, p. 606.e1-606.e5.

28. **Wikman, AT., Tiblad, E., Reilly, M., et al.** Noninvasive single-exon fetal RHD determination in a routine screening program in early pregnancy: *Obstet Gynecol*, 2012, 120, p. 227–234.

MUDr. Tereza Kratochvílová
Porodnicko-gynekologická klinika
LF UP a FN
I. P. Pavlova 6
775 20 Olomouc
e-mail: terka.dolezalova@seznam.cz