



Ciljana zaščita RhD-negativnih nosečnic z imunoglobulinom anti-D v 28. tednu nosečnosti v severovzhodni Sloveniji

Targeted prophylaxis in RhD-negative pregnant women with anti-D immunoglobulin in the 28th week of pregnancy in northeastern Slovenia

Natalija Lehner,¹ Irena Bricl,² Bojana Bizjak¹

Izveček

Ciljana zaščita z imunoglobulinom anti-D je program, ki na podlagi presejalnega testa omogoča neinvazivno določitev plodovega genotipa *RHD* iz periferne krvi RhD-negativne nosečnice. Pred uvedbo določanja predvidenega fenotipa RhD so vse RhD-negativne nosečnice prejele zaščito z imunoglobulinom anti-D v 28.–30. tednu nosečnosti. V Evropi 40 % RhD-negativnih nosečnic nosi RhD-negativen plod in zaščite ne potrebuje, saj med materjo in plodom ni RhD-neskladnosti in zato ni nevarnosti senzibilizacije na antigen RhD. Z uvedbo tega testa pa nosečnice zaščito z imunoglobulinom anti-D prejmejo ciljno glede na predvideni plodov fenotip RhD. Z uvedbo nacionalnega programa je Slovenija postala ena redkih držav v svetovnem merilu, ki izvaja ciljno zaščito z imunoglobulinom anti-D.

Abstract

Targeted protection is a program that allows noninvasive determination of the fetal *RHD* genotype from the peripheral blood of an RhD-negative pregnant woman based on a screening test. Prior to the introduction of predicted RhD phenotyping, all RhD-negative pregnant women received protection with anti-D immunoglobulin at 28 to 30 weeks of pregnancy. In Europe, 40% of RhD-negative pregnant women carry an RhD negative foetus and do not develop D antigen sensitization. With the introduction of mentioned test pregnant women receive immunoglobulin anti-D targeted protection according to the predicted foetal RhD phenotype. With the introduction of the national programme Slovenia has become one of the few countries worldwide implementing targeted protection with anti-D immunoglobulin.

¹ Center za transfuzijsko medicino, Univerzitetni klinični center Maribor, Maribor, Slovenija

² Zavod RS za transfuzijsko medicino, Ljubljana, Slovenija

Korespondenca / Correspondence: Natalija Lehner, e: natylehner@gmail.com

Ključne besede: predviden plodov fenotip RhD; presejalni test; preventivno injiciranje; imunoglobulin anti-D

Key words: predicted fetal phenotype RhD; screening test; preventive inoculation; immunoglobuline anti-D

Prispelo / Received: 31. 1. 2022 | **Sprejeto / Accepted:** 15. 6. 2022

Citirajte kot/Cite as: Lehner N, Bricl I, Bizjak B. Ciljana zaščita RhD-negativnih nosečnic z imunoglobulinom anti-D v 28. tednu nosečnosti v severovzhodni Sloveniji. Zdrav Vestn. 2023;92(1–2):43–51. DOI: <https://doi.org/10.6016/ZdravVestn.3336>



Avtorske pravice (c) 2023 Zdravniški Vestnik. To delo je licencirano pod Creative Commons Priznanje avtorstva-Nekomercialno 4.0 mednarodno licenco.

1 Uvod

Antigen RhD je med do zdaj poznanimi eritrocitnimi antigeni najbolj imunogen. Senzibilizacija na antigen RhD lahko nastane pri RhD-negativni ženski zaradi izpostavljenosti RhD-pozitivnim eritrocitom med nosečnostjo, s transfuzijo krvi ali po presaditvi organov. Nastanek aloprotiteles anti-D lahko stimulira že 0,1–1 ml RhD-pozitivnih plodovih eritrocitov v krvnem obtoku matere.

Med nosečnostjo prihaja do spontanah fetomaternalnih krvavitev (FMK). Verjetnost za FMK se povečuje proti koncu nosečnosti (3 % v prvem, 12 % v drugem, 45 % v tretjem trimesečju) in je največja ob porodu (1). Pri 80 % posameznikov, ki na eritrocitih nimajo antigena RhD, transfuzija 200 ml RhD-pozitivnih eritrocitov povzroči imunski odziv s tvorbo protiteles anti-D. Aloprotitelesa anti-D so klinično pomembna, saj lahko v naslednji nosečnosti povzročijo hudo obliko hemolitične bolezni ploda in novorojenčka (HBPN) (2).

HBPN zaradi RhD-neskladja med materjo in plodom je bolezen, ki nastane zaradi materinih aloprotiteles anti-D (razreda IgG), ki prehajajo skozi posteljico. Aloprotitelesa se v plodovem krvnem obtoku vežejo na antigen RhD, ki ga je plod podedoval po očetu, in povzročijo hemolizo eritrocitov v vranici ter zato anemijo. Zaradi anemije pride do povečane eritropoeze v kostnem mozgu, jetrih in vranici; posledica je hepatosplenomegalija. Zaradi hitrejšega propadanja eritrocitov v krvni obtok vstopijo nezreli, nukleirani eritrociti (*angl.* erythroblastosis fetalis). Posledici povečane eritropoeze v jetrih sta zmanjšana tvorba albumina in portalna hipertenzija. Generalizirani edem ploda, ki nastane kot posledica hipoproteinemije, zmanjšane tvorbe albumina in srčnega popuščanja, imenujemo hidrops ploda. Nezdravljeni hidrops ploda povzroči smrt. Ob razpadu eritrocitov se v krvni obtok sprošča bilirubin, ki ga materina jetra presnavljajo. Po rojstvu pa se raven bilirubina vedno poveča, saj plodova jetra še niso dovolj zrela za presnovo. Če pa je bila raven bilirubina visoka že pred rojstvom, lažje preseže prag, ki lahko vodi v trajne možganske okvare – kernikterus (3).

Za preprečevanje senzibilizacije na antigen RhD izvajamo primarne in sekundarne ukrepe. S primarnimi ukrepi preprečujemo pojav aloprotiteles pred prvo nosečnostjo, in sicer s transfuzijami RhD-negativnih krvnih komponent deklicam in ženskam v rodni dobi, ki so RhD-negativne. Na sekundarni ravni pa senzibilizacijo preprečujemo z vnosom imunoglobulina anti-D (Ig

anti-D) ob dogodkih, ki predstavljajo visoko tveganje za senzibilizacijo (transfuzija, nosečnost, porod, spontana ali umetna prekinitev nosečnosti ...) (4).

Pojav klinično pomembnih protiteles anti-D po transfuziji RhD-neskladnih eritrocitov oz. drugih krvnih komponent je danes v Sloveniji izjemno redek zaradi zagotavljanja RhD-skladnih krvnih komponent. V praksi se srečujemo z aloprotitelesi, ki so posledica nosečnosti, kljub dostopni imunoprofilaksi. Najpogosteje zaradi spontanah prekinitev nosečnosti ob neprepoznani nosečnosti, zaradi izpuščenega odmerka Ig anti-D ob imunizirajočih dogodkih, nezadostne imunoprofilakse, krvavitev v nosečnosti in ne nazadnje tudi zaradi človeške napake. Za velik delež senzibilizacij ne najdemo vzroka, ki bi ga lahko časovno prepoznali (tihe FMK med nosečnostjo).

Pred uvedbo imunoprofilakse z Ig anti-D sta velika obolevnost in smrtnost zaradi HBPN predstavljali velik javnozdravstveni problem povsod po svetu (5). Obravnava RhD-negativnih nosečnic v ginekoloških ambulantah je v zadnjih desetletjih doživela številne dejansko revolucionarne spremembe.

V prvem delu prispevka bomo predstavili zgodovino uvajanja imunoprofilakse z Ig anti-D v svetu in v Sloveniji, v drugem delu pa bomo predstavili obravnavo nosečnic in rezultate raziskave o ciljni zaščiti RhD-negativnih nosečnic z Ig anti-D v 28. tednu nosečnosti v severovzhodni Sloveniji.

Raziskava je potekala v Centru za transfuzijsko medicino Univerzitetnega kliničnega centra Maribor (CTM, UKC Mb).

2 Zgodovina uvajanja imunoprofilakse z Ig anti-D

Prvi opisani primer HBPN sega v leto 1609. Opisala ga je francoska babica Louyse Bourgeois ob rojstvu dvojčkov; eden od njiju je umrl zaradi hidropsa, drugi pa tretji dan po tem, ko se je razvila huda zlatenica in kernikterus. Takrat še niso poznali povezave hidropsa, zlatenice in posledičnih možganskih okvar zaradi povišanega bilirubina s HBPN. Do konca 19. stoletja so v literaturi opisali še 70 podobnih primerov. Povezavo hidropsa ploda, anemije, kernikterusa in eritroblastov v krvnem obtoku s HBPN je opisal Diamond s sodelavci šele leta 1932 (6). Patologinja Ruth Darrow je predpostavljala, da plodovi eritrociti, ki vsebujejo plodov

hemoglobin, prehajajo v materin krvni obtok. Plodov hemoglobin naj bi materin imunski sistem prepoznal kot tujek, proti kateremu je nosečnica začela tvoriti protitelesa. Ta protitelesa so prek posteljice prehajala nazaj v plodov krvni obtok, kjer so uničila plodove eritrocite. Na ta način so ugotovili pravilno patogenezo HBPN, napačno pa so predpostavljali antigen, saj gre za antigen v membrani eritrocita (danes je to antigen RhD) in ne za hemoglobin v notranjosti eritrocita (7).

Z odkritjem krvnoskupinskega sistema Rhesus pa so bili odkriti tudi temelji za razumevanje etiologije HBPN. Sistem Rhesus sta odkrila Landsteiner in Wiener leta 1940. Leto kasneje je Levine prepoznal antigen RhD kot vzrok senzibilizacije med nosečnostjo. Sredi 60. let prejšnjega stoletja so v New Yorku, Liverpoolu in Angliji izvedli prve poskuse za preprečevanje imunizacij. RhD-negativnim moškim prostovoljcem so vbrizgali RhD-pozitivne eritrocite in na ta način pridobili protitelesa, ki so jih uporabili za preprečevanje senzibilizacij. V Evropi in Severni Ameriki so bili pripravki Ig anti-D na voljo od leta 1968 (8).

Z uvedbo vbrizganja pripravkov Ig anti-D po porodu se je incidenca aloimunizacije zmanjšala s 16 % na približno 2 %, po uvedbi profilakse z Ig anti-D med nosečnostjo pa na 0,1–0,3 % (9).

Postopoma so se oblikovala priporočila za preprečevanje senzibilizacije na antigen RhD, ki se med posameznimi državami nekoliko razlikujejo glede indikacij in priporočenega odmerka Ig anti-D (10,11). V Sloveniji so se prva priporočila za preprečevanje senzibilizacije na antigen RhD izoblikovala leta 1970, ko se je v Sloveniji začela rutinska preventivna zaščita za vse RhD-negativne nosečnice, ki so imele prekinitev nosečnosti, znotraj-maternični poseg ali so rodile RhD-pozitivnega otroka. Od leta 1994 pa je obvezno tudi predporodno vbrizganje Ig anti-D v 28. tednu nosečnosti.

Tako so predporodno zaščito prejele vse RhD-negativne nosečnice, tudi tiste, ki so nosile RhD-negativen plod. V Evropi je 40 % plodov RhD-negativnih. Ker med materjo in plodom ni bilo RhD-neskladnosti, pri njih ni bilo nevarnosti senzibilizacij, zato zaščita ni bila potrebna. Zaščito so po priporočilih prejele vse RhD-negativne nosečnice, saj se plodova krvna skupina (KS) RhD v nosečnosti ni določala, ampak šele ob rojstvu (12). Določitev plodovega antigena RhD v času nosečnosti je bila možna z invazivnimi postopki (kordocenteza, amniocenteza, biopsija horionskih resic) pridobivanja plodove DNA iz plodovih celic, ki so predstavljali tveganje za nosečnico in plod. Največje tveganje teh invazivnih postopkov je povečano tveganje za spontano prekinitev nosečnosti ali prezgodnji porod. Ob invazivnem posegu

med nosečnostjo se pri dostopu preko posteljice poveča možnost senzibilizacije. Deformacije udov pa so posledica pomanjkanja plodovnice ob predčasnem razpoku plodovih ovojev kot posledica posegov v maternici. Tveganje za zaplete je v takih primerih večje od dobiti za RhD-negativno nosečnico, zato se ti posegi niso izvajali in so nosečnice prejele zaščito z Ig anti-D (13). Pomemben zgodovinski mejnik je predstavljalo odkritje zunajcelične plodove DNA (zcp-DNA) v plazmi nosečnice leta 1997 (14). Zcp-DNA v krvnem obtoku matere je možno zaznati že v 5. tednu nosečnosti, njena koncentracija pa narašča z gestacijsko starostjo ploda. Spoznanje, da se prosta zcp-DNA nahaja v materinem krvnem obtoku, pa je odprlo možnosti za določanje plodove KS RhD med nosečnostjo in s tem za razvijanje ciljane zaščite (13,14).

Genotipizacijo *RHD* in program ciljane zaščite kot rutinski test na nacionalni ravni izvajajo Danska, Nizozemska, Finska, Belgija, Združeno kraljestvo in od 1. 10. 2018 tudi Slovenija (15-20).

2.1 Uvedba ciljane zaščite v Sloveniji

Pred 20 leti so se v Sloveniji začeli vzpostavljati temelji za razvoj in uvedbo ciljane zaščite na Zavodu RS za transfuzijsko medicino (ZTM). Leta 2004 so bili objavljeni rezultati raziskave, v kateri so določili plodovo KS RhD med nosečnostjo. V raziskavo je bilo vključenih 96 RhD-negativnih nosečnic, ki so bile v 23. do 33. tednu nosečnosti – 6 od 96 nosečnic je imelo prisotna protitelesa specifičnosti anti-D. Iz venske krvi nosečnic so osamili plodovo DNA s prilagojenim načinom po Finningu s sodelavci ter določili plodov genotip *RHD* in njegov spol (odsotnost ali prisotnost gena *SRY*). Na instrumentu ABI Prism 7900 Sequence Detection System so z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR) detektirali gen *RHD*. Določili so prisotnost treh delov genskega zapisa *RHD*: intron 4, ekson 7 in ekson 10. Dobljeni rezultati so pokazali, da je bila napoved predvidenega plodovega fenotipa RhD in spola 100-odstotno natančna tako v skupini nesenzibiliziranih nosečnic kot tudi pri senzibiliziranih nosečnicah (21).

Leta 2011 je bilo v raziskavo vključenih še 153 RhD-negativnih nosečnic, ki so bile v 7. do 38. tednu nosečnosti – 18 jih je imelo prisotna protitelesa anti-D. Fetalni *RHD* so določili s pomočjo qPCR. Določali so prisotnost: introna 4, eksona 5, 7, 10 in gena *SRY*. Rezultati genotipizacije *RHD* so se primerjali s KS RhD otroka po rojstvu, ki je bila določena iz popkovnične krvi. Ugotovili so 100-odstotno natančno predvidevanje plodovega fenotipa RhD (22). Plodovo DNA v

materini plazmi je bilo možno z dodatnim postopkom pomnoževanja zaznati v prvem trimesečju nosečnosti, in sicer že od 9. tedna nosečnosti dalje (23).

V naslednjih letih se je izvedba določanja plodovega genotipa *RHD* izpopolnila in izboljšala. Avtomatski način osamitve plodove DNA je bil boljši, varnejši in bolj kakovosten kot ročna metoda. Za določevanje genskega zapisa so se dodajali dodatni deli genskega zapisa, saj se je s tem povečala pravilna napoved predvidenega plodovega fenotipa RhD (24).

Neinvazivna določitev plodovega genotipa *RHD* iz periferne krvi matere je presejalni test, ki se izvaja v 25.–26. tednu nosečnosti za ciljano zaščito z Ig anti-D v 28. tednu nosečnosti. Potrdila sta ga Razširjeni strokovni kolegij (RSK) za transfuzijsko medicino in RSK za ginekologijo in porodništvo. Validiranje celotnega protokola za napoved plodovega genotipa *RHD* je bilo opravljeno na večjem številu vzorcev za to gestacijsko starost.

Oktober 2016 je Zdravstveni svet Ministrstva za zdravje RS potrdil predlog ZTM za uvedbo novega programa, poimenovanega »Neinvazivna določitev plodovega genotipa *RHD* iz periferne krvi RhD-negativnih nosečnic – presejalni test« (25).

11. maja 2018 je bil v Uradnem listu RS objavljen Pravilnik o spremembah Pravilnika o transfuzijskih preiskavah in o postopkih ob transfuziji, ki opredeljuje novosti pri imunohematoloških preiskavah med nosečnostjo in po porodu. Ta spremenjeni pravilnik je tako vključeval uvedbo presejalnega testa: neinvazivna določitev plodovega genotipa *RHD* iz periferne krvi RhD-negativnih nosečnic (26).

Izvajanje testa se je začelo 1. 10. 2018 na ZTM. Sledilo je enoletno prehodno obdobje uvajanja novega programa. V tem obdobju smo za potrebe določanja natančnosti določitev plodove krvne skupine RhD iz materine periferne krvi pri vseh novorojencih določali KS AB0, RhD, K in DCT, pri čemer je bila potrjena 100-odstotna zanesljivost metode genotipizacije plodovega *RHD* iz periferne krvi RhD-negativnih nosečnic. Prav tako je bilo ugotovljeno, da kar 40,8 % RhD-negativnih nosečnic nosi RhD-negativen plod, kar pomeni, da niso potrebovale zaščite z Ig anti-D (27). Po enoletnem prehodnem obdobju se KS AB0, RhD, K in DCT določajo samo tistim novorojencem, pri katerih je bil z genotipizacijo *RHD* predvideni plodov fenotip RhD-pozitiven, pri otročnicah pa rutinsko določimo ICT in količino FMK (28).

Genotipizacija *RHD* ploda nam omogoča določitev predvidenega plodovega fenotipa RhD iz periferne krvi nosečnice v 25.–26. tednu nosečnosti, na podlagi katerega se odločamo o preventivnem vbrizganju Ig anti-D

v 28. tednu nosečnosti in o potrebi po pošiljanju vzorcev novorojencev in otročnic ter o poporodni zaščiti z Ig anti-D.

3 Obravnava nosečnic v Sloveniji

3.1 Obravnava nosečnic

Med osnovne imunohematološke preiskave, ki jih pri vseh nosečnicah opravimo do 12. tedna nosečnosti, spadajo: določitev KS AB0, RhD, Kell (K) in indirektni Coombsov test (ICT) za ugotavljanje nepričakovanih aloprotiteles v plazmi nosečnice (29). Aloimunizacijo RhD-negativnih nosečnic preprečujemo s transfuzijo RhD-skladnih krvnih komponent in z imunoprofilakso z Ig anti-D v nosečnosti in po porodu. Zato je pri nosečnicah pomembna natančna določitev KS RhD, na podlagi katere se odločamo o potrebi po perinatalnem vbrizganju Ig anti-D.

Kadar pri serološkem testiranju KS RhD v epruveti in na gelu dobimo močno pozitiven rezultat (4+ od 4+), nosečnici opredelimo KS RhD-pozitivno oz. pri negativnem rezultatu KS RhD-negativno. O variantah antigena RhD (RhD-var) govorimo takrat, ko dobimo pri serološkem testiranju z reagentom anti-D šibko pozitivne rezultate (manj od 4+), na podlagi tega testiranja pa ne moremo natančno opredeliti RhD-var. RhD-var natančno opredelimo z dodatnim testiranjem z molekularno biološko metodo, ki se izvaja na ZTM. Med RhD-var spadajo šibki RhD, parcialni RhD in D_{el} (30).

Tako lahko nosečnice, ki jim določimo šibki RhD tipov 1, 2 in 3 (predstavljajo večino šibkih RhD), obravnavamo enako kot RhD-pozitivne nosečnice. Zaščite z Ig anti-D v nosečnosti in po porodu ne potrebujejo. Nosečnice, ki jim določimo katero koli drugo obliko D-var, pa lahko ob stiku z antigenom RhD tvorijo protitelesa anti-D, zato potrebujejo, tako kot RhD-negativne nosečnice, zaščito z Ig anti-D. Pri njih določitev plodovega genotipa *RHD* iz periferne krvi ni mogoča (kajti iz periferne krvi matere bi osamili dele materinega gena *RHD*), zato te nosečnice obravnavamo po priporočilih za RhD-negativne nosečnice, ki so veljala pred uvedbo ciljne zaščite (opisano v podpoglavju 3.1.2) (31,32).

3.1.1 Obravnava RhD-negativnih nosečnic s protitelesi anti-D

Pri nosečnicah, ki so senzibilizirane na antigen RhD, opravimo serološko določitev antigena RhD pri biološkem očetu. Če je oče s serološkimi testi RhD-negativen, je tudi plod RhD-negativen. V primeru, da je

oče s serološkimi testi RhD-pozitiven in je homozigot (D/D), je KS RhD ploda 100-odstotno pozitivna. V primeru, da je oče heterozigot (D/d), pa je verjetnost, da je plod RhD-pozitiven, 50-odstotna. Zigotnosti antigena RhD pri očetu ne moremo določiti s serološkimi testi, saj antigen RhD nima antitetičnega antigena, kot ga ima na primer antigen K (K/k). Zigotnost antigena RhD se določa na ZTM. Priporoča se, da se pri senzibiliziranih nosečnicah vedno naredi genotipizacija *RHD* ploda iz periferne krvi nosečnice od 16. tedna dalje. Na podlagi rezultata lahko predvidevamo možnost razvoja HBPN in načrtujemo vodenje nosečnosti (33,34).

3.1.2 Obravnava RhD-negativnih nosečnic brez protiteles anti-D

Pred uvedbo programa ciljne zaščite smo RhD-negativne nosečnice obravnavali po ustaljenih smernicah. RhD-negativnim nosečnicam smo v 28. tednu nosečnosti naredili ICT. Če protitelesa anti-D niso bila prisotna ali so bila posledica predhodnega preventivnega vbrižganja Ig anti-D, smo priporočali zaščito z Ig anti-D. V Sloveniji imamo na voljo dve zdravili: Rhesonativ in Rhophylac. Po porodu smo novorojencem določili KS AB0, RhD, K in DCT. Otročnice so poporodno zaščito prejele, če so rodile RhD-pozitivnega otroka. Po porodu smo otročnicam določili ICT in ocenili količino FMK (na ZTM) ter priporočali še dodatni odmerek (glede na obseg FMK).

Z uvedbo ciljne zaščite z Ig anti-D pa se pri nosečnicah od 25. tedna nosečnosti o vbrižganju Ig anti-D odločamo na podlagi predvidenega fenotipa RhD ploda (opisano v podglavju 4.2).

RhD-negativne nosečnice, pri katerih je na mestu preventivno vbrižganje Ig anti-D do 25. tedna nosečnosti (npr. spontana ali umetna prekinitve nosečnosti, vaginalna krvavitev, zunajmaternična nosečnost, amniocenteza, poškodba trebuha ...), obravnavamo po že ustaljenih smernicah, ki smo jih upoštevali pred uvedbo novega presejalnega testa. Genotipizacije *RHD* ploda ne izvajamo rutinsko (28,29,35).

3.2 Določitev plodovega genotipa *RHD* iz periferne krvi nosečnice

Plodov genotip *RHD* določamo z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR) na ZTM iz vzorca zunajcelične DNA (zc-DNA), izolirane iz plazme RhD-negativne nosečnice v 25.–26. tednu nosečnosti. To je presejalni test za ciljno zaščito z Ig anti-D. Iz venske krvi nosečnice moramo najprej osamiti zcp-DNA, kar opravimo na avtomatiziran način z aparatom BioRobot

EZ1. Za čim višjo pravilno napovedno vrednost predvidenega genotipa *RHD* ploda se določa prisotnost več delov gena *RHD* (eksoni 5, 7, 10). Za izključitev lažno negativnih rezultatov preiskave je ključna potrditev prisotnosti zcp-DNA v vzorcu. Določamo prisotnost genov *SRY* in albumin (*ALB*). Gen *SRY* se nahaja na kromosomu Y. Njegova prisotnost napove moški spol, odsotnost pa ženski spol. Reakcija qPCR se izvaja z aparatom GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) s standardnim programom (24).

4 Obravnava nosečnic v Centru za transfuzijsko medicino Univerzitetnega kliničnega centra Maribor in raziskava o ciljani zaščiti RhD-negativnih nosečnic z Ig anti-D v 28. tednu nosečnosti v severovzhodni Sloveniji

4.1. Obravnava nosečnic v Centru za transfuzijsko medicino Univerzitetnega kliničnega centra Maribor

V CTM, UKC Mb naredimo pri vseh nosečnicah do 12. tedna nosečnosti osnovne imunohematološke preiskave: določitev KS AB0, RhD, K in ICT. KS RhD serološko določimo v epruveti (reagent anti-D IgM, Diagast) in na gelu (DiaClon AB0/D+Reverse Grouping, Bio-Rad, s katero ne zaznamo RhD kategorije VI). Kadar pri serološkem testiranju pri določitvi KS RhD dobimo šibko pozitiven rezultat (< 4+), od leta 2015 dodatno opravimo razširjeno serološko testiranje na parcialni RhD s komercialnim setom ID-Partial RhD typing Set (Bio-Rad, Nemčija) ter tudi genotipizacijo gena *RHD* na ZTM (36). Sicer obravnavamo nosečnice v skladu z opisanimi smernicami (poglavji 3.1 in 4.2).

4.2 Ciljana zaščita z Ig anti-D ter navodila za pošiljanje vzorcev in naročilnic v Centru za transfuzijsko medicino Univerzitetnega kliničnega centra Maribor

Za izvajanje programa ciljne zaščite RhD-negativnih nosečnic z Ig anti-D za testiranje potrebujemo dva vzorca periferne venske krvi nosečnice: 2-krat po 6 ml z antikoagulantom EDTA. Vzorca periferne krvi je treba odvzeti v 25.–26. tednu nosečnosti in ju poslati skupaj z naročilnicama v CTM, UKC Mb.

Prvi vzorec uporabimo za eritrocitne serološke preiskave, ki jih opravimo v CTM, UKC Mb, drugi vzorec pa za določitev plodovega genotipa *RHD*, ki se izvaja le na ZTM.

Tabela 1: Porazdelitev naročilnic glede na določitev predvidenega fenotipa RhD in brez določitve.

Leto	Število naročilnic za ciljano zaščito z Ig anti-D	Število naročilnic za apliciranje Ig anti-D določitve predvidenega plodovega fenotipa RhD	Skupaj
2018 (1. 10. - 31. 12.)	47	54	101
2019	531	35	566
2020	446	52	498
2021 (1. 10. - 30. 09.)	412	15	427
Skupaj	1.436 (90,2 %)	156 (9,8 %)	1.592 (100 %)

Za eritrocitne imunohematološke preiskave je potrebna naročilnica za določitev antigena RhD, ICT in preventivno vbrizganje Ig anti-D. Iz vzorca krvi določimo oz. potrdimo KS RhD pri nosečnici. V primeru, da je predviden fenotip RhD ploda pozitiven, naredimo še ICT (iz vzorca krvi, starega 3 dni, izjemoma do 5 dni) in izdamo izvid s priporočilom o preventivnem odmerku Ig anti-D v 28. tednu nosečnosti. Nosečnicam, ki nosijo RhD-negativen plod, ICT ne naredimo in izdamo izvid, da zaščite z Ig anti-D ne potrebujejo.

Na drugi naročilnici za imunohematološke preiskave mora biti označeno polje za preiskavo: Določitev plodovega genotipa *RHD* iz venske krvi nosečnice – ciljano zaščita z Ig anti-D. Naročilnico skupaj z vzorcem pošljemo na ZTM. Vzorca, prispeli na ZTM do 7. ure zjutraj, se še isti dan testirajo. Naročilnici morata biti pravilno izpolnjeni in morata obvezno vsebovati matične podatke o nosečnici, kontaktne podatke naročnika, preiskavo in trajanje nosečnosti v tednih ter podatek o datumu zadnjega prejema Ig anti-D. Genotipizacija *RHD* se lahko opravi v vzorcu krvi, starem 5 dni ali manj (37). Na ta časovni interval moramo biti še posebej pozorni pri pošiljanju vzorcev iz perifernih ginekoloških ambulant, ko vzorce krvi pripeljejo prek Enote za transfuzijsko dejavnost (ETD) Murska Sobota ali Ptuj v CTM, UKC Mb. V praksi to pomeni, da prevoz traja že 2 dni, preden vzorec pride v CTM, UKC Mb, od koder ga pošljemo na ZTM.

4.3 Raziskava o ciljani zaščiti RhD-negativnih nosečnic z Ig anti-D v 28. tednu nosečnosti v severovzhodni Sloveniji

V raziskavo smo vključili vse RhD-negativne nosečnice, ki smo jih od 1. 10. 2018 do 30. 9. 2021 obravnavali v CTM, UKC Mb in priporočali zaščito z Ig anti-D v 28. tednu nosečnosti. V Laboratoriju za imunohematologijo smo iz transfuzijskega informacijskega sistema DATEC

pripravili ustrezne izpise, retrospektivno pa pregledali medicinsko dokumentacijo ter poiskali podatke, na podlagi katerega smo priporočili zaščito (ciljano, glede na predvideni fenotip RhD ali brez njega). Podatke smo vnesli v program Excel in jih analizirali. Raziskavo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (številka: 0120-555/2021/3, datum odobritve 22. 12. 2021).

V CTM, UKC Mb smo v 3-letnem obdobju, tj. od 1. 10. 2018 do 30. 9. 2021, obravnavali 1.592 RhD-negativnih nosečnic, ki so zaščito z Ig anti-D prejele v 28.–30. tednu nosečnosti. V tem obdobju smo zaščito z Ig anti-D priporočali glede na predvideni fenotip RhD ploda pri 1.436 (90,2 %) nosečnicah, pri 156 (9,8 %) pa po priporočilih, ki so veljala pred uvedbo programa ciljane zaščite, saj nismo prejeli dodatnega vzorca in naročilnice za določitev plodovega genotipa *RHD*. V Tabeli 1 je prikazana porazdelitev naročilnic za zaščito z Ig anti-D v 28. tednu nosečnosti glede na predvideni fenotip RhD ploda ali brez določitve.

Glede na genotipizacijo *RHD* je bilo 830 (57,8 %) plodov RhD-pozitivnih, zato smo svetovali zaščito z Ig anti-D v 28. tednu nosečnosti, 592 (41,2 %) plodov pa je bilo RhD-negativnih, zato nosečnice zaščite niso potrebovale. V 14 primerih (1 %) je bil predviden fenotip RhD ploda nejasen, zato smo zaščito z Ig anti-D po priporočilih vseeno svetovali. V navedenih primerih je 11 otročnic rodilo RhD-pozitivnega otroka in 3 otročnice RhD-negativnega otroka. V Tabeli 2 so prikazani rezultati genotipizacije *RHD* za določitev predvidenega fenotipa RhD ploda iz periferne krvi matere.

V Tabeli 3 je prikazana KS RhD novorojenca, ki je bila serološko določena ob rojstvu iz popkovnične krvi (nosečnice so v 28. tednu nosečnosti zaščito prejele po ustaljenih priporočilih). Po že ustaljenih priporočilih pa smo obravnavali še 156 (9,8 %) nosečnic. Ker nismo dobili dodatne naročilnice in vzorca za molekularno

Tabela 2: Predvideni plodov fenotip RhD.

Leto	RhD-pozitiven	RhD-negativen	RhD-nejasen	Skupaj
2018 (1. 10. - 31. 12.)	22	25	0	47
2019	304	224	3	531
2020	253	186	7	446
2021 (1. 10. - 30. 09.)	251	157	4	412
Skupaj	830 (57,8 %)	592 (41,2 %)	14 (1 %)	1.436 (100 %)

Tabela 3: Vbrizganje Ig anti-D v 28. tednu nosečnosti po ustaljenih smernicah brez genotipizacije plodovega RHD in KS RhD novorojenca, ki se določita ob rojstvu.

Leto	KS RhD, določena ob rojstvu otroka		Skupaj
	RhD-pozitivna	RhD-negativna	
2018 (1. 10. - 31. 12.)	33	21	54
2019	20	15	35
2020	33	19	52
2021 (1. 10. - 30. 09.)	7	8	15
Skupaj	93 (59,6 %)	63 (40,4 %)	156 (100 %)

preiskavo od lečečih ginekologov, smo izdali priporočilo za zaščito z Ig anti-D v 28. tednu nosečnosti. Od 156 nosečnic jih je 63 (40,4 %) rodilo RhD- negativnega otroka, kar pomeni, da zaščite v nosečnosti niso potrebovale. Od 156 nosečnic jih je 6 zaščito prejelo po 30. tednu (med 32. in 36. tednom nosečnosti). V 5 primerih je šlo za t. i. nevodeno nosečnost in v 1 primeru je nosečnica prišla iz tujine, kjer pa ni dobila ustrezne zaščite. Pri 93 (59,6 %) novorojenčih smo določili, da je KS RhD-pozitivna, zato je bila v teh primerih zaščita upravičena.

Naročilo za vbrizganje Ig anti-D v 28. tednu nosečnosti (brez naročila za genotipizacijo RHD) pa so pogosto poslali, če so RhD-negativno nosečnico v ginekološki ambulanti obravnavali po 26. tednu nosečnosti.

Zaradi epidemije covid-19 se je leta 2020 povečalo število naročilnic za vbrizganje Ig anti-D brez naročila za določitev predvidenega fenotipa RhD, čeprav se je na ZTM preiskava izvajala ves čas. Naročnike smo o tem sproti obveščali, naša obvestila pa so le delno upoštevali.

Iz rezultatov naše raziskave v CTM, UKC Mb smo ugotovili, da je 658 (41 %) RhD-negativnih nosečnic rodilo RhD-negativnega otroka. Podobni rezultati so bili ugotovljeni tako na ZTM v enoletnem obdobju uvajanja

preiskave kot tudi v drugih evropskih državah (npr. Belgija 39 %, Danska 37,3 %, Združeno kraljestvo 36 %) (9,27,38).

Ker se je metoda genotipizacije RHD izkazala za 100-odstotno zanesljivo, smo po enem letu prehodnega obdobja začeli določati KS AB0, RhD, K in DCT samo tistim novorojenčcem, pri katerih je bil predvideni fenotip RhD pozitiven – pri otročnici pa določimo ICT in FMK. Države, ki izvajajo program ciljne zaščite, imajo različne pristope glede poporodnega vbrizganja Ig anti-D. V Sloveniji se o poporodni zaščiti odločamo na podlagi genotipizacije RHD ploda s kontrolo pozitivnih rezultatov (predviden fenotip RhD-pozitiven). V Franciji pa se o poporodni zaščiti odločajo na podlagi predvidenega fenotipa RhD ploda s kontrolo negativnih rezultatov (28).

V skupini nosečnic, ki so zaščito z Ig anti-D prejele v 28. tednu nosečnosti (predviden fenotip RhD ploda ni bil določen), nismo opazili več zapletov v primerjavi s skupino, ki je prejela zaščito z Ig anti-D glede na predvideni fenotip RhD ploda. Namen presejalnega testa je ciljana zaščita z Ig anti-D pri tistih RhD-negativnih nosečnicah, ki nosijo RhD-pozitiven plod, in zaščito resnično potrebujejo.

5 Dobrobiti programa Ciljana zaščita: racionalna raba Ig anti-D

Ig anti-D je zdravilo iz krvi humanega izvora. V letih 1960–1970 so bile darovalke plazme ženske, ki so se senzibilizirale med nosečnostjo. Z uvedbo poporodne in predporodne imunoprofilakse pa je bil ta vir izkoreninjen. Kasneje so bili imunizirani darovalci moški prostovoljci, kar je etično sporno.

Čeprav je zdravilo varno (presejalno testiranje posameznih enot plazme na specifične kazalce okužb), pa obstaja nevarnost prenosa še neznanih patogenov. Z morebitnim razvojem monoklonskega ali rekombinantnega anti-D lahko zmanjšamo tveganja, ki so povezana s človeškimi krvnimi pripravki (39). Zdravilo je drago in marsikje v svetu ni dostopno vsem RhD-negativnim ženskam. Zato je racionalna raba zdravila nadvse pomembna. Racionalna raba zdravila se je povečala z uvedbo neinvazivnega prenatalnega diagnosticiranja po odkritju zcp-DNA v materinem krvnem obtoku. Pri nosečnicah, ki nimajo prisotnih aloprotiteles anti-D, nam omogoča ciljano zaščito pri 60 % nosečnic, ki zaščito zares potrebujejo, ker nosijo RhD-pozitiven plod (37).

Nosečnice, ki nosijo RhD-negativen plod, nimajo tveganja za aloimunizacijo. Z racionalno rabo Ig anti-D pri teh nosečnicah preprečimo nepotrebno vbrizganje in se izognemo pojavu redkih neželenih učinkov zdravila. Pojavlja se tudi vprašanje etične spornosti, če Ig anti-D rutinsko uporabljamo kljub možnosti genotipizacije (40).

6 Zaključek

Določitev predvidenega fenotipa RhD je varna preiskava tako za plod kot za nosečnico. Naše izkušnje in poročila drugih evropskih držav so po rezultatih primerljiva. V 3-letnem obdobju izvajanja preiskave imamo

100-odstotno zanesljive rezultate predvidenega fenotipa RhD ploda, kar nam omogoča ciljano vbrizganje Ig anti-D pri 60 % nosečnic, ki zaščito resnično potrebujejo.

V 3-letnem obdobju programa ciljane zaščite smo v CTM, UKC Mb pri 156 RhD-negativnih nosečnicah priporočali zaščito z Ig anti-D v 28. tednu nosečnosti po ustaljenih smernicah, ker nismo prejeli naročila za določitev predvidenega fenotipa RhD. Da bi zmanjšali nepotrebno vbrizganje Ig anti-D pri RhD-negativnih nosečnicah, bi lahko v sklopu bolnišničnega transfuzijskega odbora izvedli dodatno izobraževanje, na katerem bi opozorili na dosledno izvajanje programa ciljane zaščite, racionalno rabo Ig anti-D, in na izvajanje genotipizacije *RHD* po 26. tednu nosečnosti, če je RhD-negativna nosečnica v ginekološki ambulanti obravnavana po 26. tednu nosečnosti. Lečeče ginekologe, ki bodo RhD-negativno nosečnico napotili v CTM, UKC Mb (oz. ETD Murska Sobota in ETD Ptuj) na odvzem krvi, oz. če bodo k nam poslali vzorec krvi z naročilnico za vbrizganje Ig anti-D v 28. tednu nosečnosti, bomo obvestili in se dogovorili za dodaten vzorec z naročilnico za genotipizacijo *RHD*.

S sodelovanjem z ginekologi in nosečnicami ter dodatnim izobraževanjem lahko delež nosečnic, ki smo jih obravnavali brez določitve plodovega genotipa *RHD* iz periferne krvi nosečnice, dodatno znižamo in tako zagotovimo še večjo varnost nosečnic in bolj kakovostno obravnavo.

V svetovnem merilu je Slovenija ena redkih držav, ki izvaja ciljano zaščito. Izvajanje programa pomeni velik napredek na preventivnem področju obravnave RhD-negativnih nosečnic.

Izjava o navzkrižju interesov

Avtorji nimamo navzkrižja interesov.

Literatura

- Lieberman L, Clarke G, Svensson AM. Perinatal Issues in Transfusion Practice. In: Cohn CS, Delaney M, Johnson ST, Katz LM, eds. Technical Manual of the American Association of Blood Banks. 20th ed. Maryland: AABB; 2020. pp. 659-72.
- Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. *Blood*. 2000;95(2):375-87. DOI: 10.1182/blood.V95.2.375 PMID: 10627438
- de Haas M, Thurik FF, Koelewijn JM, van der Schoot CE. Haemolytic disease of the fetus and newborn. *Vox Sang*. 2015;109(2):99-113. DOI: 10.1111/vox.12265 PMID: 25899660
- Delaney M, Matthews DC. Hemolytic disease of the fetus and newborn: managing the mother, fetus, and newborn. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2015;2015(1):146-51. DOI: 10.1182/asheducation-2015.1.146 PMID: 26637714
- Basu S, Kaur R, Kaur G. Hemolytic disease of the fetus and newborn: current trends and perspectives. *Asian J Transfus Sci*. 2011;5(1):3-7. DOI: 10.4103/0973-6247.75963 PMID: 21572705
- Jackson ME, Baker JM. Hemolytic disease of the fetus and newborn: Historical and Current State. *Clin Lab Med*. 2021;41(1):133-51. DOI: 10.1016/j.cll.2020.10.009 PMID: 33494881
- Dubey R, Trigunait P, Pawar A, Yadav AK. Haemolytic Disease of the Fetus and Newborn: Past, Present and Future Considerations. *Acta Scientific Medical Science*. 2019;3(10):153-61. DOI: 10.31080/ASMS.2019.03.0425
- Bowman J. Thirty-five years of Rh prophylaxis. *Transfusion*. 2003;43(12):1661-6. DOI: 10.1111/j.0041-1132.2003.00632.x PMID: 14641860

9. Blanco S, Giacomi VS, Slobodianiuk LG, Frutos MC, Carrizo LH, Fanin GE, et al. Usefulness of Non-Invasive Fetal RHD Genotyping towards Immunoprophylaxis Optimization. *Transfus Med Hemother.* 2018;45(6):423-8. DOI: [10.1159/000490156](https://doi.org/10.1159/000490156) PMID: 30800032
10. Sperling JD, Dahlke JD, Sutton D, Gonzalez JM, Chauhan SP. Prevention of RhD Alloimmunization: A Comparison of Four National Guidelines. *Am J Perinatol.* 2018;35(2):110-9. DOI: [10.1055/s-0037-1606609](https://doi.org/10.1055/s-0037-1606609) PMID: 28910850
11. Liunbruno GM, D'Alessandro A, Rea F, Piccinini V, Catalano L, Calizzani G, et al. The role of antenatal immunoprophylaxis in the prevention of maternal-foetal anti-Rh(D)alloimmunisation. *Blood Transfus.* 2010;8(1):8-16. PMID: 20104273
12. Clausen FB, Damkjær MB, Dziegiel MH. Noninvasive fetal RhD genotyping. *Transfus Apheresis Sci.* 2014;50(2):154-62. DOI: [10.1016/j.transci.2014.02.008](https://doi.org/10.1016/j.transci.2014.02.008) PMID: 24642067
13. Parchure DS, Kulkarni SS. Noninvasive fetal RHD genotyping from maternal plasma. *Glob J Transf Med.* 2016;1(1):21-8. DOI: [10.4103/2455-8893.178007](https://doi.org/10.4103/2455-8893.178007)
14. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997;350(9076):485-7. DOI: [10.1016/S0140-6736\(97\)02174-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)02174-0) PMID: 9274585
15. Clausen FB, Christiansen M, Steffensen R, Jørgensen S, Nielsen C, Jakobsen MA, 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(4):752-8. DOI: [10.1111/j.1537-2995.2011.03362.x](https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03362.x) PMID: 21995641
16. Clausen FB, Steffensen R, Christiansen M, Rudby M, Jakobsen MA, Jakobsen TR, et al. Routine noninvasive prenatal screening for fetal RHD in plasma of RhD-negative pregnantwomen-2years of screening experience from Denmark. *Prenat Diagn.* 2014;34(10):1000-5. DOI: [10.1002/pd.4419](https://doi.org/10.1002/pd.4419) PMID: 24860987
17. de Haas M, Thurik FF, van der Ploeg CP, Veldhuisen B, Hirschberg H, Soussan AA, et al. Sensitivity of fetal RHD screening for safe guidance of targeted anti-D immunoglobulinprophylaxis: prospective cohort study of a nationwide programme in the Netherlands. *BMJ.* 2016;355:i5789. DOI: [10.1136/bmj.i5789](https://doi.org/10.1136/bmj.i5789) PMID: 27821701
18. Haimila K, Sulin K, Kuosmanen M, Sareneva I, Korhonen A, Natunen S, et al. Targeted antenatal anti-D prophylaxis program for RhD-negative pregnant women - outcomeof the first two years of a national program in Finland. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2017;96(10):1228-33. DOI: [10.1111/aogs.13191](https://doi.org/10.1111/aogs.13191) PMID: 28718198
19. Minon JM, Gerard C, Senterre JM, Schaaps JP, Foidart JM. Routine fetal RHD genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium. *Transfusion.* 2008;48(2):373-81. PMID: 18039319
20. Yang H, Llewellyn A, Walker R, Harden M, Saramago P, Griffin S, et al. High-throughput, non-invasive prenatal testing for fetal rhesus D status in RhD-negativewomen: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med.* 2019;17(1):37. DOI: [10.1186/s12916-019-1254-4](https://doi.org/10.1186/s12916-019-1254-4) PMID: 30760268
21. Slovenija. PravilnikiPravilnik o transfuzijskih preiskavah in postopkih ob transfuziji. *Ur l RS.* 2018;28(32).
22. Peyrard T, Wagner FF. The Rh System. In: Cohn CS, Delaney M, Johnson ST, Katz LM, eds. *Technical Manual of the American Association of Blood Banks.* 20th ed. Maryland: AABB; 2020. pp. 329-54.
23. Daniels G. Variants of RhD—current testing and clinical consequences. *Br J Haematol.* 2013;161(4):461-70. DOI: [10.1111/bjh.12275](https://doi.org/10.1111/bjh.12275) PMID: 23432139
24. Kacker S, Vassallo R, Keller MA, Westhoff CM, Frick KD, Sandler SG, et al. Financial implications of RHD genotyping of pregnant women with a serologic weak Dphenotype. *Transfusion.* 2015;55(9):2095-103. DOI: [10.1111/trf.13074](https://doi.org/10.1111/trf.13074) PMID: 25808011
25. Qureshi H, Massey E, Kirwan D, Davies T, Robson S, White J, et al.; British Society for Haematology. BCSH guideline for the use of anti-D immunoglobulin for the prevention of haemolyticdisease of the fetus and newborn. *Transfus Med.* 2014;24(1):8-20. DOI: [10.1111/tme.12091](https://doi.org/10.1111/tme.12091) PMID: 25121158
26. Bettelheim D, Panzer S, Reesink HW, Csapo B, Pessoa C, Guerra F, et al. Monitoring and treatment of anti-D in pregnancy. *Vox Sang.* 2010;99(2):177-92. DOI: [10.1111/j.1423-0410.2010.01322.x](https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2010.01322.x) PMID: 20331536
27. White J, Qureshi H, Massey E, Needs M, Byrne G, Daniels G, et al.; British Committee for Standards in Haematology. Guideline for blood grouping and red cell antibody testing in pregnancy. *Transfus Med.* 2016;26(4):246-63. DOI: [10.1111/tme.12299](https://doi.org/10.1111/tme.12299) PMID: 27074872
28. Toly-Ndour C, Huguet-Jacquot S, Mailloux A, Delaby H, Canellini G, Olsson ML, et al. Rh disease prevention: the European Perspective. *ISBT Sci Ser.* 2021;16(1):106-18. DOI: [10.1111/voxs.12617](https://doi.org/10.1111/voxs.12617)
29. Bricl I, Dovč-Drnovšek T, Blejec T, Rožman P. Določanje plodove krvne skupine med nosečnostjo. *Zdrav Vestn.* 2004;73(Suppl. I):139-42.
30. Dovč-Drnovšek T, Klemenc P, Toplak N, Blejec T, Bricl I, Rožman P. Reliable Determination of Fetal RhD Status by RHD Genotyping from Maternal Plasma. *Transfus Med Hemother.* 2013;40(1):37-43. DOI: [10.1159/000345682](https://doi.org/10.1159/000345682) PMID: 23637648
31. Dovč-Drnovšek T, Toplak N, Bricl I, Blejec T, Kovač M, Rožman P. An Additional Pre- amplification Step for the Early determination of Fetal RHD fromMaternal Plasma. In: Gahan PB, ed. *Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum.* Dordrecht: Springer Netherlands; 2001. pp. 147-51.
32. Dovč-Drnovšek T. Določanje plodovega genotipa RHD iz plazme RhD-negativnih nosečnic z metodo PCR vrealnem času. [PhD Thesis]. Ljubljana: Dovč-Drnovšek T; 2013.
33. Bricl I. Ciljana zaščita z IgG anti-D. Neinvazivna določitev plodovega genotip RhD iz perifernekrvi RhD-negativnih nosečnic. In: Stezinar Sl, ed. *Zbornik predavanj strokovnih srečanj Združenja za transfuzijsko medicino Slovenije.* 2017 Apr 7-8; Zreče, Slovenija. V Ljubljani: Slovensko zdravniško društvo; 2017.
34. Slovenija. PravilnikiPravilnik o spremembah Pravilnika o transfuzijskih preiskavah in postopkih ob transfuziji. *Ur l RS.* 2018. ;28(104).
35. Hartman T, Dovč-Drnovšek T, Bricl I. Uvedba nacionalnega programa Neinvazivna določitev plodovega genotipa RHD iz perifernekrvi RhD-negativnih-presejalni test na Zavodu RS za transfuzijsko medicino. *Isis.* 2020:38-41.
36. Clausen FB, Hellberg A, Bein G, Bugert P. Recommendation for validation and quality assurance on non-invasive prenatal testingfor foetal blood groups and implications for IVD risk classification according toEU regulations. *Vox Sang.* 2021;117(2):157-65. DOI: [10.1111/vox.13172](https://doi.org/10.1111/vox.13172) PMID: 34155647
37. Sandler SG, Flegel WA, Westhoff CM, Denomme GA, Delaney M, Keller MA, et al.; College of American Pathologists Transfusion Medicine Resource Committee Work Group. It's time to phase in RHD genotyping for patients with a serologic weak D phenotype. *Transfusion.* 2015;55(3):680-9. DOI: [10.1111/trf.12941](https://doi.org/10.1111/trf.12941) PMID: 25438646
38. Finning K, Martin P, Summers J, Massey E, Poole G, Daniels G. Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhDimmunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *BMJ.* 2008;336(7648):816-8. DOI: [10.1136/bmj.39518.463206.25](https://doi.org/10.1136/bmj.39518.463206.25) PMID: 18390496
39. Kumpel BM. Efficacy of RhD monoclonal antibodies in clinical trials as replacement therapy forprophylactic anti-D immunoglobulin: more questions than answers. *Vox Sang.* 2007;93(2):99-111. DOI: [10.1111/j.1423-0410.2007.00945.x](https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2007.00945.x) PMID: 17683353
40. Kent J, Farrell AM, Soothill P. Routine administration of Anti-D: the ethical case for offering pregnant women fetalRHD genotyping and a review of policy and practice. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2014;14(1):87. DOI: [10.1186/1471-2393-14-87](https://doi.org/10.1186/1471-2393-14-87) PMID: 24568571