



Lékařská
fakulta

**Stanovení *RHD* genotypu plodu u RhD negativních
těhotných žen**

Disertační práce

MUDr. Tereza Kratochvílová

Školitel: Prof. MUDr. Marek Ľubušký, Ph.D., MHA

Olomouc 2020

OBSAH

1. PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATEK	4
2. PODĚKOVÁNÍ	6
3. ÚVOD	7
4. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	8
4.1 <i>Krevně skupinový systém Rh</i>	10
4.1.1 Dědičnost	10
4.1.2 Antigen "D"/protilátka anti-D	10
4.1.3 Incidence antigenu "D"	11
4.1.4 Incidence protilátky anti-D u těhotných žen	12
4.1.5 Incidence RhD inkompatibilních těhotenství	12
4.2 <i>Volná fetální DNA</i>	14
4.3 <i>Prevence RhD aloimunizace</i>	16
4.4 <i>Management těhotenství s rizikem rozvoje HDFN</i>	21
4.4.1 Erytrocytární aloimunizace	21
Diagnostika HDFN	23
4.4.2 Léčba HDFN	31
4.4.3 Porod a léčba novorozence s HDFN	33
5. CÍLE PRÁCE.....	35
6. MATERIÁL A METODIKA	36
6.1 <i>Izolace a zpracování materiálu</i>	38
6.2 <i>TaqMan Real Time PCR</i>	38
6.3 <i>QF-PCR</i>	39
7. VÝSLEDKY	40
7.1 <i>TaqMan Real Time PCR</i>	40
7.2 <i>QF-PCR</i>	42
8. DISKUZE	44
9. ZÁVĚR	51

10. LITERATURA (citace uvedeny dle normy ČSN ISO 690)	53
11. Seznam publikací a přednášek	66
11.1 <i>Práce související s disertační prací</i>	66
11.1.1 Původní vědecké publikace v daném oboru uveřejněná v časopise s IF	66
11.1.2 Původní vědecké publikace uveřejněná v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech ...	66
11.1.3 Přehledné vědecké práce uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech	66
11.1.4 Publikovaná abstrakta	67
11.1.5 Seznam přednášek/posterů přednesených na veřejných odborných fórech	73
11.2 <i>Ostatní publikace</i>	74
11.2.1 Přehledné vědecké práce uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech	74
11.2.2 Publikovaná abstrakta	74
11.2.3 Seznam přednášek/posterů přednesených na veřejných odborných fórech	78
12. Grantové projekty	79
13. SOUHRN	80
14. SUMMARY	82
15. PŘÍLOHY	84

1. PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATEK

Cff DNA	(cell free fetal DNA) volná/mimobuněčná fetální DNA
CI	(confidence interval) interval spolehlivosti
ČGPS	Česká gynekologicko porodnická společnost
ČLS JEP	České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně
ČR	Česká republika
DNA	(deoxyribonucleotic acid) kyselina deoxyribonukleová
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
FPR	(false positive rate) falešná pozitivita
FMH	fetomaternální hemoragie
GA	(gestational age) gestační stáří
HDFN	(Hemolytic disease of the Fetus and Newborn) Hemolytická nemoc plodu a novorozence
IUT	(intrauterine transfusion) intrauterinní transfúze
IVIG	(intravenous immunoglobulin G) intravenozní imunoglobulin G
MCA-PSV	(Middle Cerebral Artery Peak Systolic Velocity) maximální průtoková rychlost v arteria cerebri media
MoM	(Multiples of the Median) násobky mediánu
NA	(not available) není dostupné
NIPT	(Noninvasive prenatal testing) neinvazivní prenatální testování
PCR	(Polymerase chain reaction) polymerázová řetězová reakce

QF-PCR	(quantitative fluorescence polymerase chain reaction) kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce
Rh	Rhesus
RFU	relativní fluorescenční jednotka
SmPC	souhrn údajů o léčivém přípravku
UK	(United Kingdom) Spojené Království
USA	(United States of America) Spojené státy americké
ÚZIS	Ústav zdravotnických informací a statistiky

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 FN 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 14.5. 2020

.....

3. ÚVOD

Problematika stanovení *RHD* genotypu plodu je v současné době řešena celosvětově. Milníkem byl rok 1997, kdy prof. Denis Lo objevuje mimobuněčnou fetální DNA v periferní krvi těhotné ženy. Díky postupnému zdokonalení vyšetřovacích metod je využívána mimobuněčné fetální DNA v různých oblastech fetální medicíny. Jednou z možností je právě její využití ke stanovení *RHD* genotypu plodu u RhD negativních těhotných žen. V některých evropských zemích je neinvazivní vyšetření rutinně zavedeno do péče o RhD negativní těhotné. V současné době v České republice (ČR) není dosud plně zavedeno rutinní vyšetření *RHD* genotypu plodu do klinického managementu u RhD negativních žen. V ČR je ročně cca 15.000 RhD negativních těhotných žen, u kterých by stanovení *RHD* genotypu plodu na začátku těhotenství mohlo být přínosné. Prevence RhD aloimunizace by byla cílená pouze u těhotenství, kde *RHD* genotyp plodu je pozitivní. Optimalizovala by se tak péče o RhD negativní těhotné. Cílem práce je zhodnotit klinickou a laboratorní efektivitu screeningu *RHD* genotypu plodu u RhD negativních žen pomocí dvou metodik.

4. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

V ČR se u všech těhotných žen v I. trimestru provádí stanovení krevní skupiny RhD. Cílem screeningu je diagnostikovat cca 15 % RhD negativních žen (v ČR ročně cca 15.000 žen), které mohou být v průběhu těhotenství a při porodu ohroženy rozvojem RhD aloimunizace. 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 o cca 10 % plodů (10.000 ročně). Dále je u všech těhotných žen v I. trimestru prováděn screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek. 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 erytrocytů přítomen komplementární antigen, jedná se o cca 60 % plodů (300 plodů ročně), naopak 40 % plodů (200 plodů ročně) komplementární antigen přítomen nemá, a tudíž nejsou ohroženy rozvojem hemolytické nemoci plodu a novorozence (HDFN). Přítomnost komplementárního antigenu lze vyšetřit neinvazivně stanovením *RHD* genotypu plodu z volné fetální DNA cirkulující v periferní krvi těhotné ženy. Klinický význam stanovení *RHD* genotypu plodu u RhD negativních žen je tedy dvojitý. Jednak v rámci provádění optimální prevence RhD aloimunizace, práce se zabývá zejména problematikou screeningu *RHD* genotypu. Druhý klinický význam, v praxi již využívaný, je využití v managementu těhotenství s rizikem rozvoje HDFN, kde již aloprotilátka anti-D je přítomna [62] [75]. Přehledně zobrazuje schéma 1 „Stanovení *RHD* genotypu plodu u RhD negativních žen“.

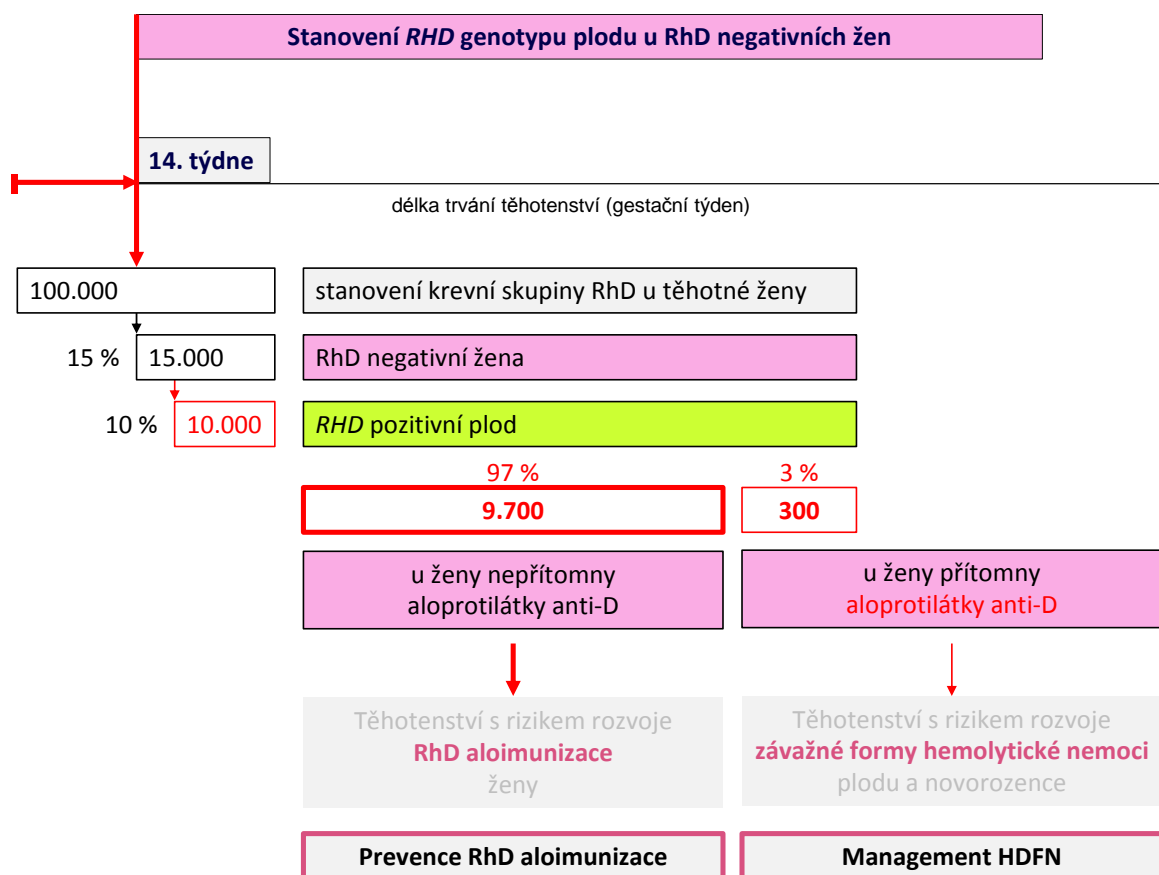


Schéma 1

Stanovení RHD genotypu plodu u RhD negativních těhotných žen

Přehledně zobrazeny možnosti klinického využití vyšetření RHD genotypu plodu u RhD negativních žen.

Upraveno dle Ľubušký et al.

4.1 Krevně skupinový systém Rh

Rh systém je po AB0 systému druhý nejvýznamnější systém krevních skupin. V roce 1939 byl objevený Landsteinerem [107]. K nejvýznamnějším antigenům Rh systému, kterých je známo více než 50, patří antigeny „D“, „C“, „c“, „E“ a „e“ [9] [123]. Jedince s exprimovaným „D“ antigenem na povrchu erytrocytů označujeme jako RhD pozitivní, jedinec s chybějícím „D“ antigenem je RhD negativní. Proti Rh antigenům se nevyskytují přirozené protilátky (výjimečně anti-E), k tvorbě protilátek proti antigenům Rh systému dochází vždy až po stimulaci imunitního systému antigeně inkompatibilními erytrocyty následkem fetomaternální hemoragie v souvislosti s těhotenstvím nebo po podání krevní transfúze [107].

4.1.1 Dědičnost

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. chromosomu. RHD gen produkuje „D“ antigen. Gen RHD má dvě alely D/d, kdy alela D je dominantní k alele d, která je zrátoovou (klinicky němou) alelou, neboť její produkt nebyl nikdy nalezen [145]. Pro expresi všech Rh antigenů je nezbytný RhAG (Rh-associated glycoprotein), který je kódován RHAG genem lokalizovaným na krátkém raménku 6. chromosomu. 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. Rhnull fenotypu [29].

4.1.2 Antigen „D“/protilátka anti-D

Antigen „D“ byl objeven jako první z Rh systému a zároveň je jeho hlavním a nejvýznamnějším antigenem. Antigen „D“ je silně imunogenní, protože u RhD negativních jedinců chybí celý RhD protein se všemi antigenními epitopy. Imunitní systém RhD negativních jedinců velmi dobře rozpozná RhD pozitivní erytrocyty a dochází k tvorbě protilátky anti-D [19]. Pronikne-li dostatečné množství RhD pozitivních erytrocytů do krevního oběhu RhD negativní těhotné, mohou způsobit rozvoj RhD aloimunizace. Objem inkompatibilních erytrocytů, nezbytně nutný k vyvolání aloimunizace, je individuální a závisí jednak na imunogenicitě RhD pozitivních fetálních erytrocytů, tak i na reaktivitě imunitního

systemu těhotné. Již objem 0,1 ml fetálních erytrocytů může vést k rozvoji aloimunizace. Přibližně u 1–2 % těhotenství dochází k aloimunizaci již antepartálně [25] [47]. Specifická antierytrocytární aloprotilátka anti-D patří mezi klinicky nejvýznamnější protilátky, která je schopná vyvolávat závažnou formu HDFN [30]. Intenzita hemolytické nemoci je vystupňována četností těhotenství. Není-li aloimunizace matky diagnostikována nebo HDFN léčena, může vést k závažné perinatální morbiditě a mortalitě [123]. Vytvoření aloprotilátky anti-D u RhD negativní ženy ve fertilním věku v souvislosti s podáním inkompatibilní krevní transfúze erytrocytů je extrémně nepravděpodobné, v případě transfúzí krevních destiček od RhD pozitivního dárce existuje malé riziko aloimunizace [80]. Dle studie u 130 RhD negativních jedinců, kteří obdrželi RhD pozitivní trombonáplav však žádný nevytvořil anti-D protilátky [104].

Existuje množství odchylek v expresi “D“ antigenu [33] . Slabé D ($D^{\text{weak}}/D^{\text{w}}$) = kvantitativní zeslabení exprese “D“ antigenu. Všechny D epitopy jsou exprimovány slabě a jedinci si při kontaktu s erytrocyty s normální expresí “D“ antigenu nevytváří protilátky anti-D. D^{weak} erytrocyty méně často než normální D erytrocyty stimulují tvorbu anti-D protilátek u RhD negativních jedinců a rovněž tak D pozitivní plod je také méně často ohrožen závažnou formou HDFN v případě RhD aloimunizace u matky [63] [97]. Variantní D ($D^{\text{variant}}/D^{\text{v}}$) = kvalitativní zeslabení exprese “D“ antigenu. Některé epitopy “D“ antigenu nejsou exprimovány a při kontaktu s D pozitivními erytrocyty si jedinci s D^{variant} fenotypem mohou vytvářet protilátky proti D epitopům, které na povrchu jejich erytrocytů chybí. Bylo popsáno více než 20 variantních “D“ antigenů, ale většina z nich se vyskytuje velmi vzácně [7] [39] [136]. Vytvoří-li si žena s D^{variant} fenotypem protilátky anti-D, může dojít k rozvoji závažné formy HDFN u D pozitivního plodu [28]. U žen s D^{variant} fenotypem je proto důležité provést prevenci RhD aloimunizace [88].

4.1.3 Incidence antigenu “D“

Antigen “D“ je přítomen u 85 % evropské populace a severoamerické bělošské populace, u 95 % černošské populace a u obyvatel dálného východu dosahuje výskyt “D“ antigenu téměř 100 % [30]. RhD pozitivní jedinci se dělí na heterozygoty pro alelu D , kterých se v bělošské populaci vyskytuje přibližně 60 %, a na homozygoty pro alelu D , kterých se v bělošské populaci vyskytuje přibližně 40 %.

4.1.4 Incidence protilátky anti-D u těhotných žen

Lubušký a kol. uvádí incidenci aloprotilátky anti-D 5,0 ‰ [76]. Geifman-Holtzman a kol. uvádí ve svém souboru incidenci 2,7 ‰. [41].

4.1.5 Incidence RhD inkompatibilních těhotenství

Přibližně 15 ‰ bílé populace je RhD negativní a RhD negativní žena má tedy asi 85% pravděpodobnost, že její partner bude RhD pozitivní (60 ‰ heterozygot a 40 ‰ homozygot pro alelu *D*). Přibližně v 10 ‰ všech těhotenství tudíž nastává situace, že RhD negativní matka bude mít RhD pozitivní plod [11] [30] [47].

Problematiku Rh systému znázorňuje obrázek 1.

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-D	-
"D"	85	D/D	34		
		D/d	51		
-	15	d/d	15	ANO	

Aloprotilátku anti-D si může vytvořit pouze RhD negativní žena po kontaktu s RhD pozitivními erytrocyty (fetomaternální hemoragie) plod může být mateřskou aloprotilátkou ohrožen hemolytickou nemocí, pokud je RhD pozitivní (incidence RhD pozitivních plodů u RhD negativních žen je 8,93 %).

na povrchu erytrocytů je antigen "D" přítomen (RhD pozitivní) nebo nepřítomen (RhD negativní)
 alela **D** je dominantní (40 % homozygotů, 60 % heterozygotů) k alele **d**, která je ztrátovou (klinicky němou) alelou, neboť její produkt nebyl nikdy nalezen

management těhotenství s diagnostikovanou aloimunizací těhotné ženy erytrocytárním antigenem "D"
 (přítomny aloprotilátky anti-D)

incidence aloprotilátky anti-D u těhotných žen 0,5 % cca 500 těhotných žen ročně v České republice
pravděpodobnost přítomnosti antigenu "D" u plodu 59,5 % 40,5 % cca 203 plodů není ohroženo hemolytickou nemocí

Obrázek 1

Krevně skupinový systém Rh - incidence antigenu „D“ a RhD inkompatibilních těhotenství v evropské populaci [62]

V České republice je u všech těhotných žen v I. trimestru prováděn screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek. 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 erytrocytů přítomen komplementární antigen, jedná se o cca 60 % plodů (300 plodů ročně), naopak 40 % plodů (200 plodů ročně) komplementární antigen přítomen nemá, a tudíž nejsou ohroženy rozvojem hemolytické nemoci plodu a novorozence (HDFN).

Upraveno dle Ľubušký et al.

4.2 Volná fetální DNA

Volnou fetální DNA (cff DNA) v mateřské cirkulaci poprvé prokázal profesor Denis Lo v roce 1997, čímž přispěl k vývoji nových metod neinvazivní prenatalní diagnostiky [71]. Původ mimobuněčné fetální DNA nebyl zcela jasný, předpokládaným zdrojem byly buňky trofoblastu [45]. Tuto hypotézu potvrzuje Alberry et al. K určení původu cff DNA byla vyšetřena krevní plazma u těhotenství bez přítomných embryonálních struktur. Koncentrace fetální DNA se statisticky významně nelišila od koncentrace u prosperujících intrauterinních těhotenství. Byla potvrzena hypotéza, že fetální DNA je do krevního oběhu matky uvolňována převážně z trofoblastu [3].

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, patologickém těhotenství apod [44].

Volnou fetální DNA lze v mateřské cirkulaci poprvé detekovat již ve 4. týdnu gravidity, což bylo prokázáno u žen, které podstoupily *in vitro* fertilizaci [54]. Hranicí gestačního stáří, kdy jsou výsledky teprve spolehlivé jsou až okolo 9. - 10. týdne těhotenství u neobězní populace [143] [44]. Množství fetální extracelulární DNA se během gravidity postupně zvyšuje [72] [110] [69] [144]. Před 20 týdnem těhotenství se fetální frakce zvyšuje o méně než 0,1% za týden, což zpochybňuje myšlenku, že opakovaný odběr cff DNA vyřeší nízkou fetální frakci [143]. Vyšetření cff DNA je přímo úměrné fetální frakci [61]. Nedávné studie uvádějí, že průměrná frakce fetální DNA je 10% [69]. Díky takto nízké fetální frakci je nutné použít citlivou metodu detekce, jakou je např. real time polymerázová řetězová reakce (PCR) [83].

Dolní hranice fetální frakce se udává 4 % cffDNA pro spolehlivý výsledek. [61]. U 0,5 % až 3 % žen kvůli nízké fetální frakci (<4 %) vyšetření nelze provést. Snížení fetální frakce souvisí s časným gestačním stářím, mateřskou obezitou, vícečetným těhotenstvím. [110]. Naopak zvýšená fetální frakce je u pacientek s preeklampsií v důsledku zvýšené apoptóze placentárního trofoblastu a následnému uvolňování extracelulárních nukleových kyselin (fetálního i mateřského původu) do cirkulace a také snížená renální clearance [69].

Volná fetální DNA přítomná v mateřské cirkulaci je po porodu rychle degradována a obvykle ji nelze detekovat již 2h od porodu [73]. Lo et al. odebírali ženám krev v rozpětí 1-42 dní po porodu. Ve všech zkoumaných případech nebyla fetální DNA detekována již první den po narození dítěte bez ohledu na způsob vedení porodu. Medián poločasu odstranění DNA plodu z krve matky byl stanoven na 16,3 minut. Volná fetální DNA je tedy z těla matky rychle

odstraněna a nehrozí proto její přetrvání do dalšího těhotenství. To je rozdíl oproti fetálním buňkám, u kterých byla prokázána přítomnost v mateřské cirkulaci až desetiletí po porodu. Využití cff DNA tak nachází využití v širokém spektru fetální medicíny, jedním z nich je právě vyšetření *RHD* genotypu plodu [70][36] [4]. Dále se cff DNA využívá ke stanovení pohlaví plodu u X vázaných dědičných onemocnění) [52], monogenních dědičných onemocnění např. achondroplazie [22], dále vyšetření aneuploidii [10].

4.3 Prevence RhD aloimunizace

V prevenci RhD aloimunizace je historicky několik momentů, které dramaticky mění doporučení a přístup v péči o RhD negativních ženy v průběhu těhotenství. Aloimunizace alopřilátkou anti-D je jako jediná preventabilní a tedy objev imunoglobulinu G anti D více než před 50. lety byl bezesporu významný a znamenal milník v péči o RhD negativní ženy. V roce 1967 publikují téměř zároveň Freda et al. v USA a Clark z UK (United Kingdom), že rozvoji aloimunizace se dá zabránit podáním imunoglobulinu, který obsahuje vysoké titry anti D, první klinické užití v různých zemích na sebe nenechalo dlouho čekat (Nizozemí, USA, Kolumbie atd.) [37] [66] [96]. Před zavedením anti-D imunoprophylaxe byla alopřilátka anti-D zodpovědná za 90 % těžkých případů HDFN. Riziko RhD aloimunizace bylo od počátku 70. let sníženo z 13 % na 1-2 % postpartálním podáním anti-D imunoglobulinu [138] [89] [82] [27]. Rutinní antenatální aplikace dále sníží incidenci RhD aloimunizace na 0,2-0,3 % [26][96][129]. Stále se ještě setkáváme s D aloimunizovanými těhotnými, příčinou může být špatně provedená, resp. neprovedená, prevence RhD aloimunizace. K senzibilizaci může dojít i na začátku těhotenství před tím, než je podána profylaxe ve 28. týdnu těhotenství.

Imunoglobulin G je krevní produkt, vyrábí se z plazmy senzibilizovaných dárců, objem produkce je tudíž limitován. Rekombinantní forma IgG anti-D zatím není k dispozici [65]. Vzhledem k tomu, že se jedná o heterologní bílkovinu, která může vyvolat nežádoucí reakci, je nutné provádět prevenci RhD aloimunizace obezřetně a pouze v indikovaných případech. V současné době je plasma senzibilizovaných dárců vyšetřována na HBsAg, anti HIV a HCV protilátky, Parvovirus B19. Možný je i přenos agens, na která není dosud žádné testování např. priony [148].

Mechanismus, kterým anti D zabraňuje aloimunizaci D, je stále nejasný [17]. Důkazy naznačují, že jednou z možností je clearance erytrocytů s navazáním anti D rychle prostřednictvím makrofágů a / nebo down regulace antigen specifických B buněk před tím, než dojde k imunitní odpovědi [64].

Přestože máme účinnou imunoprophylaxi, těžká morbidita a mortalita v důsledku HDFN se v posledních 50. letech na celém světě snížila přibližně jen o 50 %. Problém se týká zejména zemí 3. světa, kde není prováděna prevence RhD aloimunizace [141] [152]. Jednotlivé vyspělé státy se částečně liší v doporučeních k provádění prevence RhD aloimunizace (časování aplikace, indikační kritéria, stanovení *RHD* genotypu plodu) [127]. V ČR dle

doporučeného postupu má být všem RhD negativním těhotným ženám v indikovaných případech preventivně podán imunoglobulin G anti-D v dostatečné dávce.

Stanovení objemu FMH (fetomaternální hemoragie)

Je-li stanoven objem fetálních erytrocytů proniklých do oběhu matky, je indikováno podání IgG anti-D intramuskulárně v dávce 10 µg na 0,5 ml fetálních erytrocytů nebo na 1 ml plné fetální krve (objem fetální krve je dvojnásobný, předpokládaný fetální hematokrit je 50 %). Objem FMH se v běžných situacích neodebírá a podaná dávka IgG anti D je vždy s ohledem na dané gestační stáří.

Provádění prevence RhD aloimunizace u RhD negativních žen přehledně zobrazuje schéma (Schéma 2) [77].

Doporučení k provádění prevence RhD aloimunizace u RhD negativních žen

Ľubušký M.^{1,2}, Procházka M.¹, Šimetka O.³, Holusková I.⁴

¹Porodnicko-gynekologická klinika LF UP a FN Olomouc

²Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny LF UP a FN Olomouc

³Porodnicko-gynekologická klinika FN Ostrava

⁴Transfúzní oddělení FN Olomouc

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 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*

Minimální dávka*: před 20. týdnem těhotenství 50 µg (250 IU)
po 20. týdnu těhotenství*** 100 µg (500 IU)

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.

* podání větší dávky IgG anti-D není chybou

** i v případech kdy RhD fenotyp plodu není znám

*** současně je vhodné stanovit objem fetomaternální hemoragie (FMH) k upřesnění dávky

Stanovení objemu FMH

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 plně fetální krve. IgG anti-D v dávce 10 µg podané nitrosvalově by mělo pokrýt 0,5 ml fetálních RhD pozitivních RBCs nebo 1 ml plně fetální krve. FMH je objem fetálních RBCs, objem fetální krve je dvojnásobný (předpokládáný fetální hematokrit je 50%).

Revize doporučeného postupu ČGPGS ČLS JEP ze dne 3. 6. 2010, publikovaného v Čes. Gynek. 2010, 75, č. 4, s. 323-324.
Schváleno výborem ČGPGS ČLS JEP dne 25. 1. 2013, publikováno v Čes. Gynek. 2013, 78, č. 2, s. 132-133.
www.lubuisky.com

Podpořeno grantem JGA MZ ČR NS-10311-3/2009, NT-11004-3/2010, NT-12225-4/2011

Schéma 2

Prevence RhD aloimunizace u RhD negativních žen

Doporučený postup České gynekologické a porodnické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně [77].

Dalším významným objevem, který má široké využití v oblasti medicíny, je objev volné fetální DNA v plazmě těhotné ženy v roce 1997 [71].

RhD negativní žena je ohrožena rozvojem RhD aloimunizace pouze v případě, že plod má na povrchu svých erytrocytů přítomen antigen "D" (je-li RhD pozitivní), jedná se o cca 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. Na schématu 3 je názorné srovnání v provádění prevence RhD aloimunizace, kdy paušálně je imunoglobulin podáván bez znalosti *RHD* genotypu plodu (varianta A) a cílená profylaxe v závislosti na *RHD* genotypu plodu (varianta B). V některých evropských zemích je neinvazivní vyšetření rutinně zavedeno do péče o RhD negativní těhotné, aplikace imunoglobulinu je cílená u RhD pozitivních plodů. V současné době v České republice (ČR) není implementováno vyšetření *RHD* genotypu plodu do klinického managementu v prevenci RhD aloimunizace u RhD negativních žen.

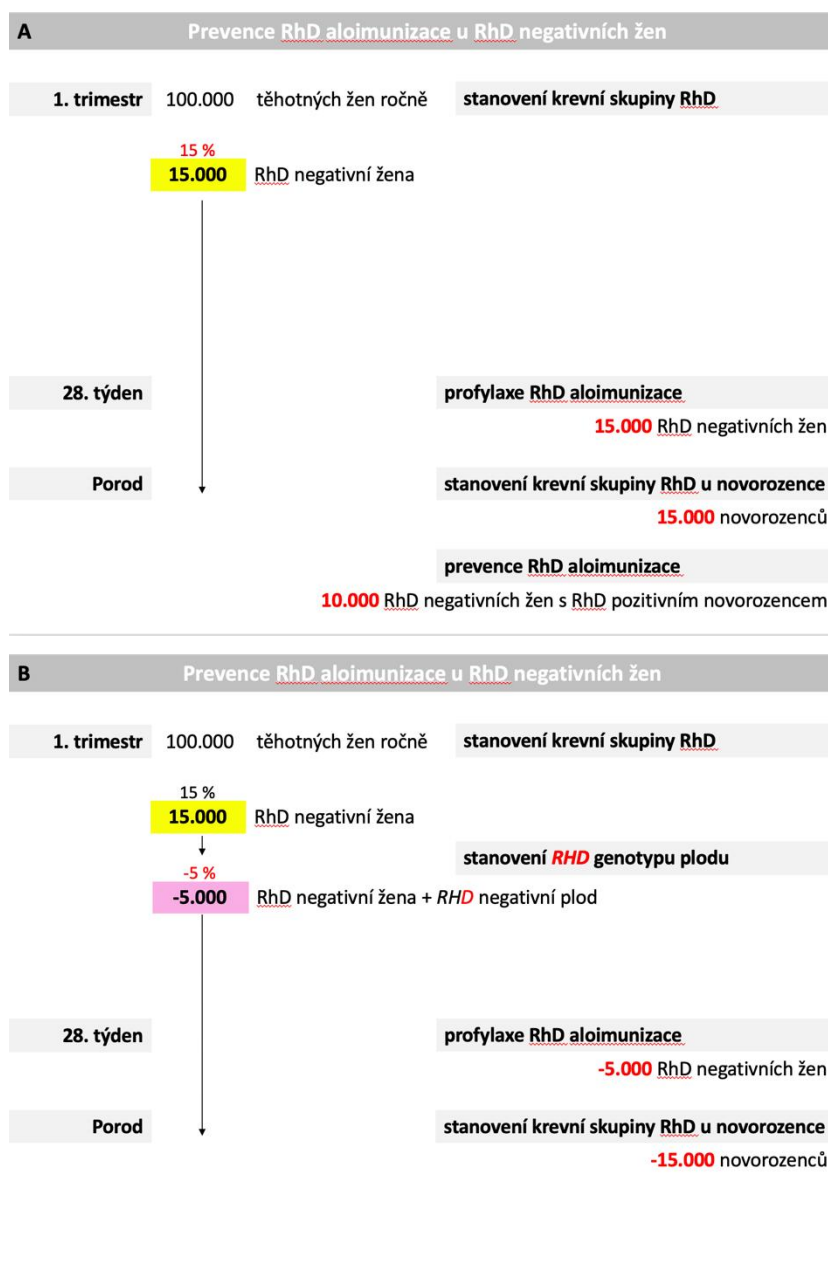


Schéma 3

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

A) předpokládaný počet indikací ročně k podání IgG 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

4.4 Management těhotenství s rizikem rozvoje HDFN

4.4.1 Erytrocytární aloimunizace

Erytrocytární aloimunizace se rozvíjí jako následek stimulace imunitního systému cizími povrchovými erytrocytárními antigeny, které následně navozují tvorbu imunních protilátek třídy IgG [18]. Erytrocytární aloimunizace může být navozena podáním krevní transfuze, která obsahuje pro příjemce transfuze jemu cizí erytrocytární antigen nebo v průběhu těhotenství následkem fetomaternální hemoragie, kdy plod zdědil po otci antigen, který není přítomen na erythrocytech matky [18] [130]. Mateřské aloprotilátky mohou v průběhu těhotenství pronikat placentou do krevního oběhu plodu, kde se navážou na fetální erythrocyty, které jsou následně destruovány v retikulo-endoteliálním systému plodu. Dochází k rozvoji HDFN, plod má anémii. Pokud se jedná o první kontakt imunitního systému matky s inkompatibilním erythrocytárním antigenem plodu, dochází ke vzniku závažné formy HDFN ve stávajícím těhotenství jen vzácně. Většinou ohroženy jsou antigenně inkompatibilní plody až v následujících těhotenstvích [50].

Algoritmus managementu těhotenství s rizikem rozvoje HDFN přehledně shrnuje schéma 4.

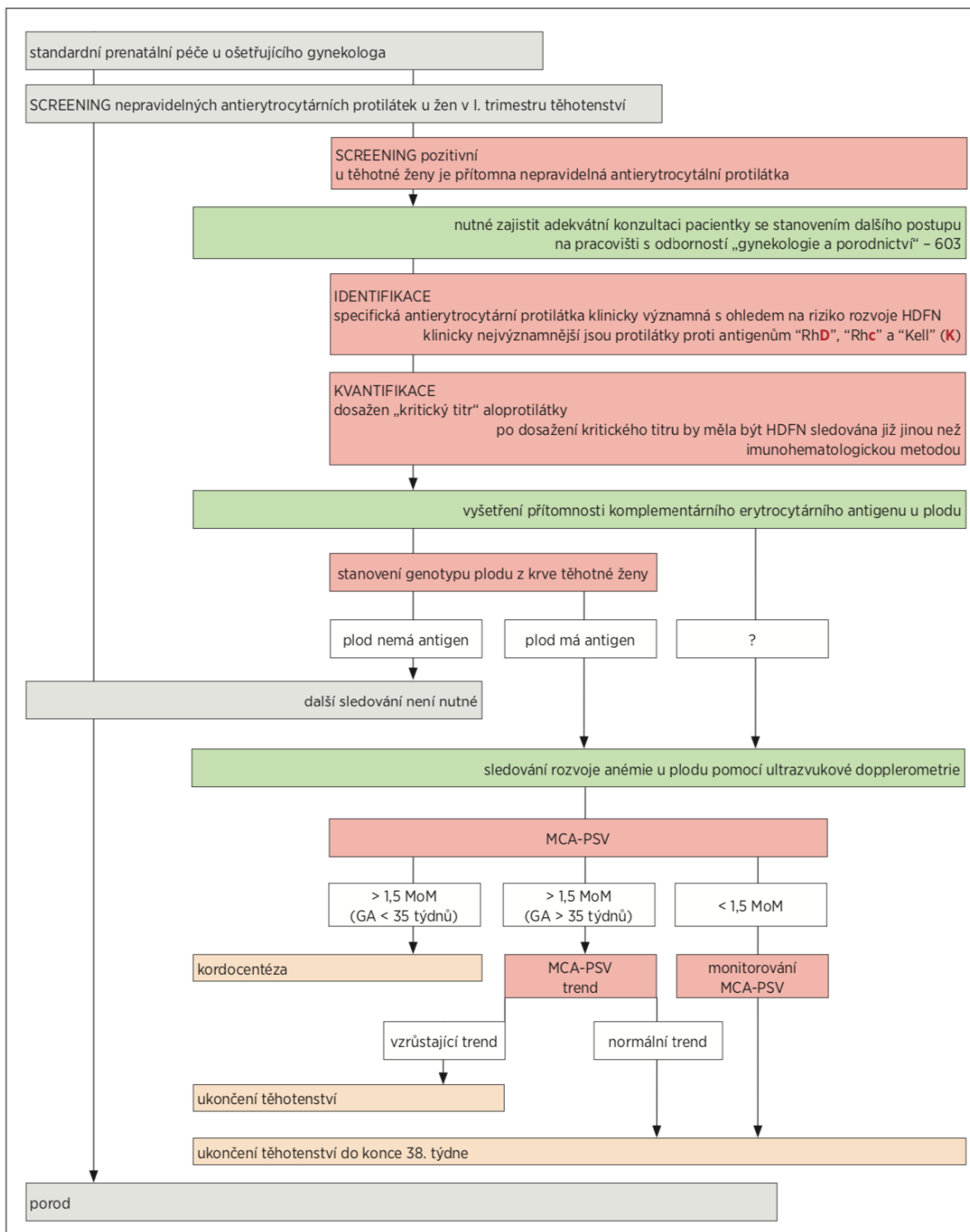


Schéma 4

Algoritmus pro management těhotenství s rizikem rozvoje závažné formy Hemolytické nemoci plodu a novorozence

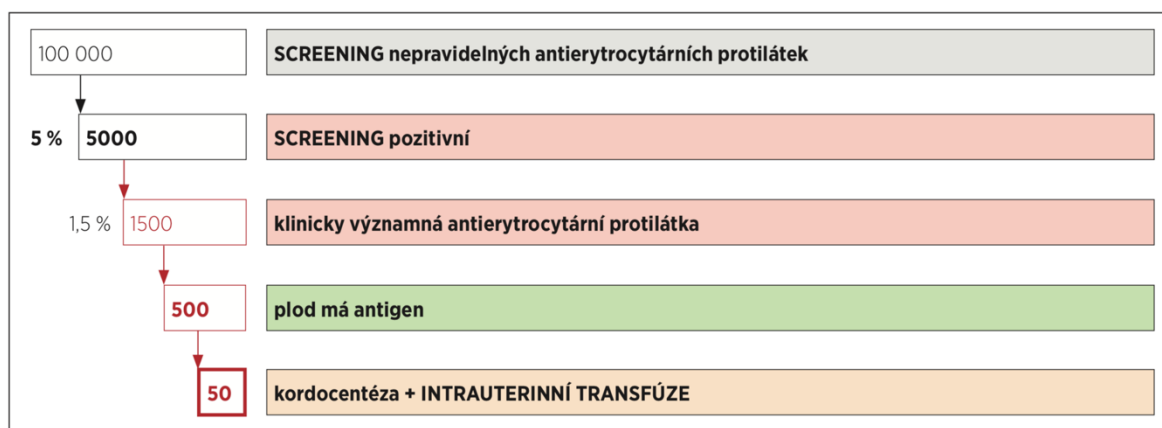
Doporučený postup České gynekologické a porodnické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně [79].

Diagnostika HDFN

Screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek

V České republice je u všech těhotných žen v I. trimestru prováděn screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek [20]. Pozitivní výsledek screeningu je u cca 5 % žen (v ČR ročně 5000 žen), u cca 1,5 % (1500 žen) se jedná o klinicky významnou aloprotilátku. Mezi klinicky nejvýznamnější aloprotilátky, schopné vyvolat závažnou formu HDFN patří kromě aloprotilátky anti-D i aloprotilátka anti-c a anti-K. Plod je však ohrožen rozvojem hemolytické nemoci pouze, má-li na povrchu svých erytrocytů přítomen komplementární antigen, cca 0,5 % plodů (500 ročně). V České republice je v současnosti možno vyšetřit genotypy *RHD*, *RHCE* a *KEL* [15] [78]. Názorně zobrazuje obrázek 2 a 3.

Přítomnost dalších aloprotilátek v kombinaci s anti-D protilátkou může být spojena s agresivnější mateřskou imunitní odpovědí, což zvyšuje riziko rozvoje těžké anémie u plodu a tato těhotenství vyžadují pečlivou observaci [87] [101] [128].

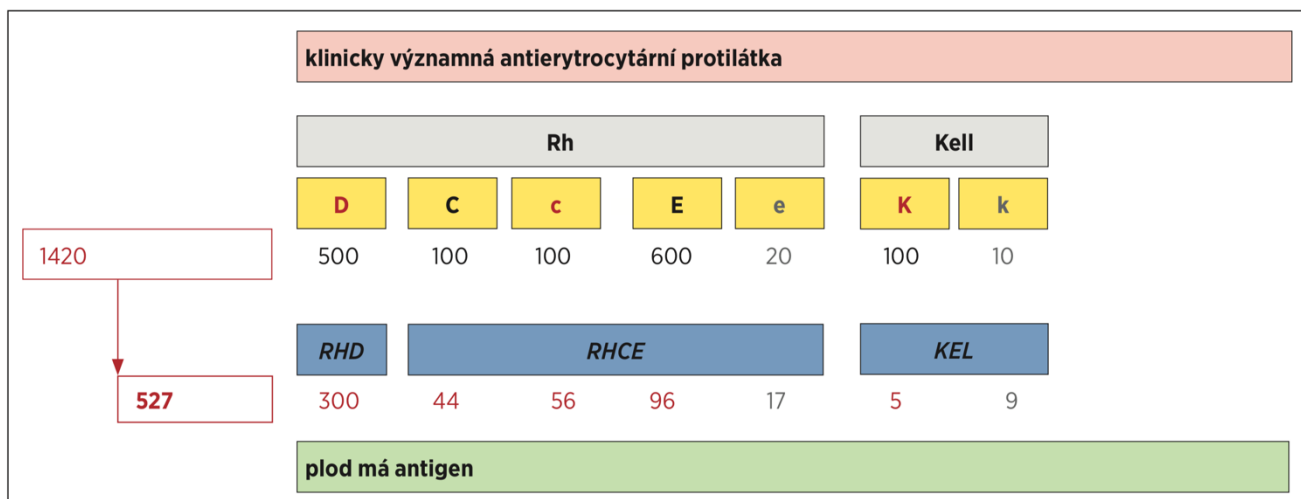


Obrázek 2

Screening těhotenství s rizikem rozvoje hemolytické nemoci plodu a novorozence [78]

V České republice je u všech těhotných žen v I. trimestru prováděn screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek. Pozitivní výsledek screeningu je u cca 5 % žen (v ČR ročně 5000 žen), u cca 1,5 % (1500 žen) se jedná o klinicky významnou aloprotilátku. 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 transfúze do 35. týdne se však rozvine jen u cca 5–10 % z nich (**25–50** plodů ročně).

Upraveno dle Ľubušký et al.



Obrázek 3

Klinický význam neinvazivního stanovení *RHD*, *RHCE* a *KEL* genotypu plodu v managementu těhotenství s rizikem rozvoje HDFN [78]

Klinicky významná aloprotilátka anti – D je diagnostikována u cca 0,5 % žen. Plod je však ohrožen pouze v případě, že má na povrchu svých erytrocytů přítomen komplementární antigen (cca 300 plodů ročně). Analogicky znázorněno pro ostatní klinicky významné aloprotilátky.

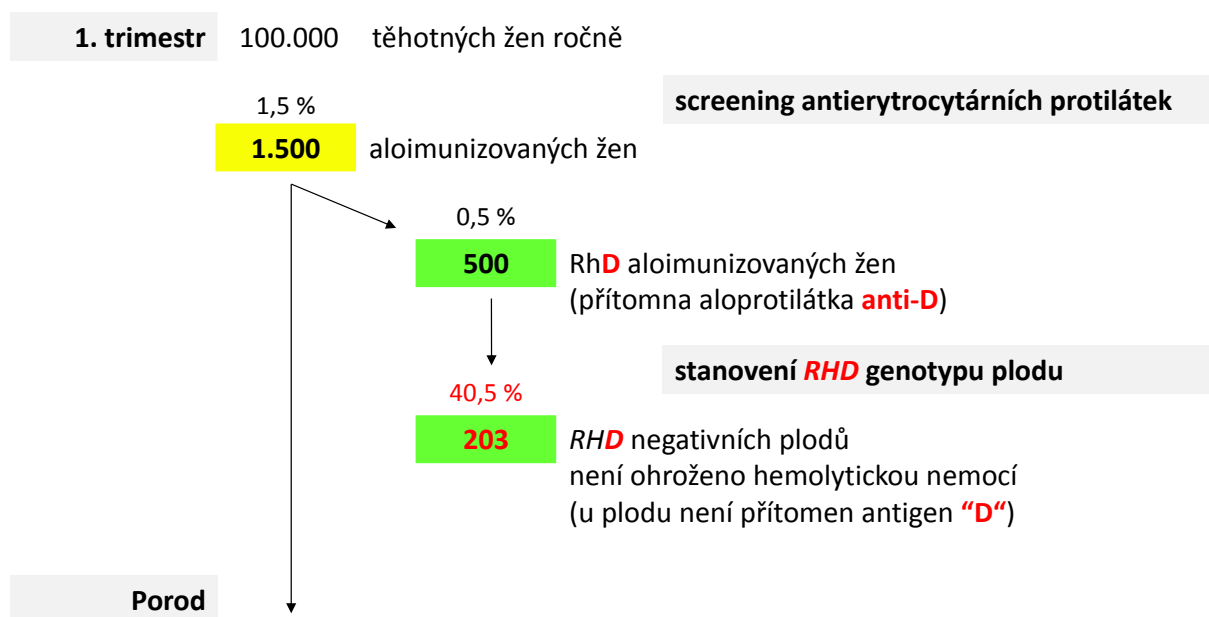
Upraveno dle Ľubušký et al.

Vyšetření genotypu plodu

Možnost neinvazivního stanovení *RHD* genotypu plodu u RhD aloimunizovaných těhotných žen umožní určit plody, které nejsou ohrožené rozvojem hemolytické nemoci plodu ani novorozence (RhD negativní, cca 40 %). Naopak RhD pozitivní plody (cca 60 %) by měly být sledovány ve specializovaných centrech zabývajících se problematikou hemolytické nemoci plodu i novorozence. Jen asi 5 % těchto plodů vyžaduje podání intrauterinní transfuze, u zbývajících plodů (cca 95 %) postačuje sledovat plod neinvazivně pomocí ultrazvukové dopplerometrie (graficky znázorňují obrázky 4 a 5). Informace o RhD pozitivitě plodu je důležitá i pro načasování ukončení těhotenství, stanovení strategie vedení porodu a následnou péči o novorozence.

Možnosti určení *RHD* genotypu plodu jsou různé, teoreticky se nabízí možnost vyšetření materiálu získaného invazivním vyšetřením (odběr plodové vody, odběr choriových klků), k těmto účelům se však v současné době tato vyšetření nevyužívají [8][93]. Dle nově publikovaného systematického přehledu je riziko potratu velmi nízké, přetrvává však zvýšené riziko rozvoje aloimunizace [116]. S objevem neinvazivního vyšetření volné fetální DNA v plazmě těhotné ženy nastává nový trend na poli medicíny. Vyšetření *RHD* a *RHCE* genotypu plodu z volné fetální DNA cirkulující v periferní krvi těhotných žen bylo v České republice poprvé zavedeno v roce 2005 Hromadníkovou et al. [51]. Pokud plod nenese na svých erythrocytech antigen, nehrozí riziko rozvoje hemolytické nemoci plodu a novorozence. Vzhledem k sekvenční unikátnosti je nejčastějším lokusem pro o určení *RHD* genotypu plodu exon 7. Práce zabývající se neinvazivním stanovením *RHD* genotypu plodu se zaměřují na uniplexové nebo multiplexové systémy. Použití multiplexového systému (např. exon 5, exon 7 a exon 10) je vhodné i pro zvýšení validity výsledku *RHD* genotypizace plodu zejména v etnicky smíšených populacích [16] [108] [147].

RhD aloimmunizace u žen v I. trimestru těhotenství

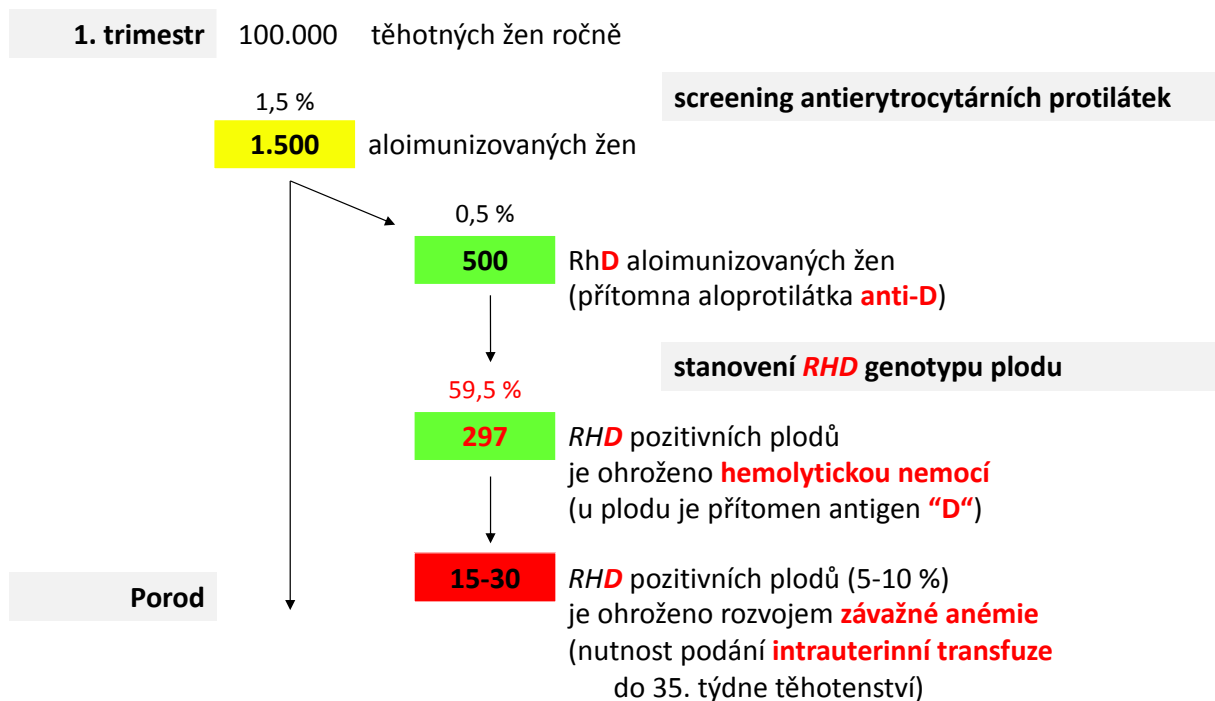


Obrázek 4

Klinický význam neinvazivního stanovení RHD genotypu plodu u RhD aloimmunizovaných těhotných žen

Možnost neinvazivního stanovení RHD genotypu plodu u RhD aloimmunizovaných těhotných žen umožní určit plody, které nejsou ohrožené rozvojem hemolytické nemoci plodu ani novorozence (RhD negativní, cca 40 %).

RhD aloimunizace u žen v I. trimestru těhotenství



Obrázek 5

Klinický význam neinvazivního stanovení RHD genotypu plodu u RhD aloimunizovaných těhotných žen

Možnost neinvazivního stanovení RHD genotypu plodu u RhD aloimunizovaných těhotných žen umožní určit plody, které jsou ohrožené rozvojem hemolytické nemoci plodu a novorozence (RhD negativní, cca 60 %).

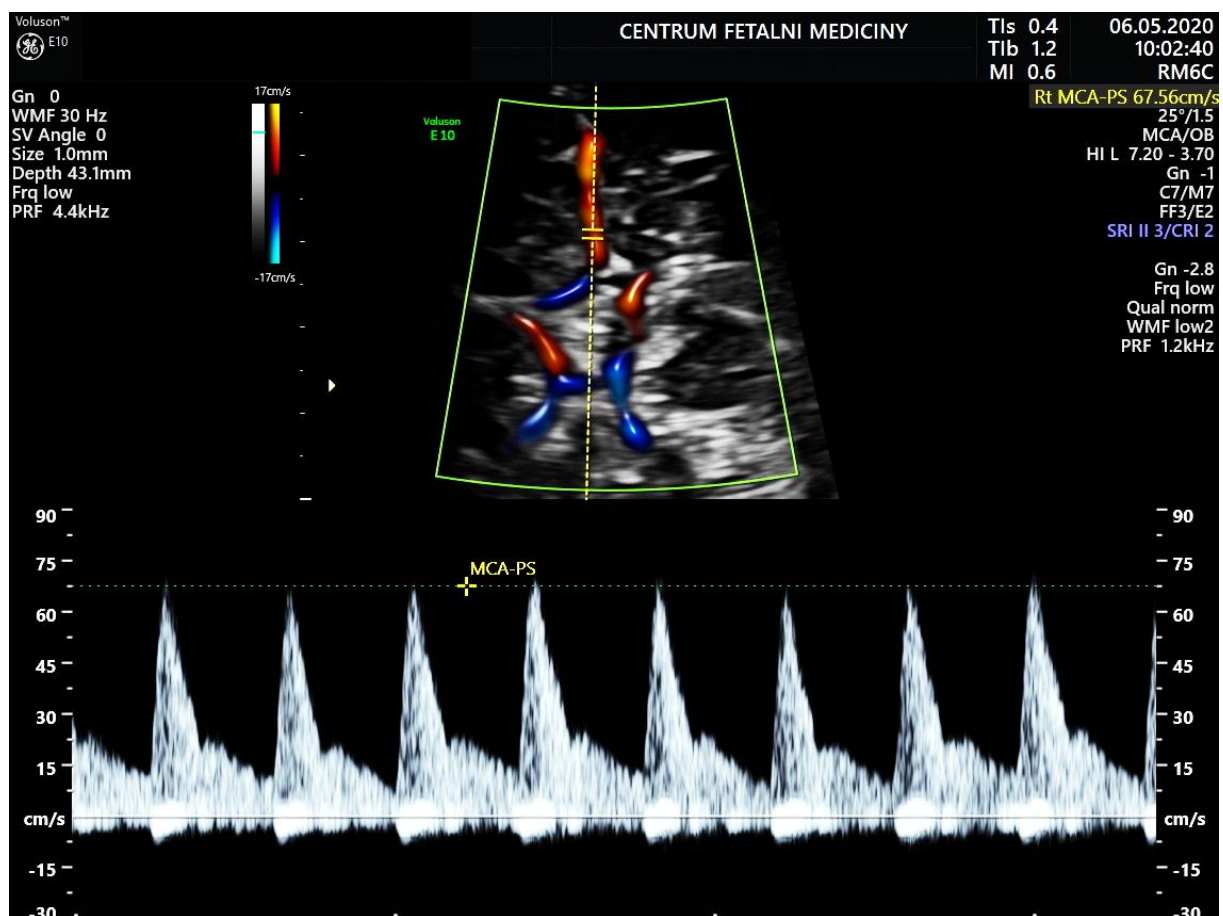
Ultrazvukové vyšetření

Mezi ultrazvukové známky anémie patří ascites v důsledku hypalbuminémie, ztluštění placenty a hepatomegalie. Vzácně je přítomen perikaridální či pleurální výpotek [105] [111] [117] [146]. Hydrops plodu se vyvíjí až pokud hodnota hemoglobinu klesne pod 70g/l [100].

Dopplerometrie

Dopplerometrické vyšetření využívá faktu, že se v důsledku nízkého hematokritu plodu zvyšuje srdeční výdej a mluvíme o tzv. hyperdynamické cirkulaci [40]. Měřením maximální průtokové rychlosti arteria cerebri media (MCA PSV) dokážeme identifikovat plody ohrožené anémií. Tento unikátní objev na poli fetální medicíny popsal prvně prof. Mari et al. [85]. Středně závažná a těžká fetální anemie odpovídá 1,5 násobku mediánu (MoM) pro dané gestační stáří. Při dodržení správné metodiky měření se senzitivita blíží 100 % a false positive rate (FPR) 12 % [55] [109]. Vyšetření MCA PSV na obrázku 6. Díky této neinvazivní metodě se již vyšetření koncentrace bilirubinu v plodové vodě pro identifikaci plodu s rizikem anémie neprovádí. MCA PSV je v současné době zlatým standardem. Predikce diagnostiky anemie plodu se s blížícím termínem porodu pomocí MCA PSV snižuje [58].

Další možností je vyšetření trikuspidální regurgitace u plodu, jako známka dekompenzace srdce, jež předchází rozvoji hydropsu [102] [32].



Obrázek 6

Stanovení maximální průtokové rychlosti v arteria cerebri media (MCA PSV)

Oblast měření „sample volume“ (1 mm) je umístěna těsně za odstup arteria cerebri media z arteria carotis interna tak, aby insonační úhel byl 0 stupňů.

4.4.2 Léčba HDFN

Kordocentéza

Kordocentéza se provádí v případě očekávání nutnosti provedení intrauterinní transfúze (IUT). Od provádění sériových kordocentéz se v souvislosti se zavedením ultrazvukové diagnostiky upustilo. Jedná se o invazivní metodu, kdy pod ultrazvukovou kontrolou je odebrána krev z vena umbilicalis ke stanovení hodnoty hematokritu, hemoglobinu, IUT je indikována při hodnotě fetálního hematokritu < 30 % nebo hemoglobinu <10 g / l [94]. Dle aktuální hodnoty hematokritu v daném gestační stáří se vypočítá množství krevní transfúze. Používá se čerstvá deleukotizovaná ozářené krev KS 0 RhD negativní krev s hematokritem cca 75-80 % [1]. Stran optimálního načasování následné transfúze je v roce 2017 publikována práce stran možnosti využití MCA-PSV k načasování další transfúze [34].

Riziko distressu plodu v souvislosti se zákrokem je nejzávažnější komplikací, jež může vést k úmrtí plodu nebo předčasnému porodu. Z možných komplikací může nastat trombóza pupečnicku, krvácení, riziko přetížení objemu, chorioamnionitida [68][135] [139]. Pozornost je třeba zaměřit i na dlouhodobější následky v souvislosti s intrauterinním výkonem. Dle LOTUS study (Long-Term follow up after intra-Uterine transfusionS) se riziko poruchy psychomotorického vývoje udává 4,8 % [67] [42] [140].

V České republice je potřeba IUT cca 30-50 ročně. Vzhledem k tak nízkému počtu výkonů a nutnosti erudice, je vhodná centralizace pacientek. Časování IUT je nejpozději do 35. týdne těhotenství, jakmile těhotenství přesáhne 35. týden, IUT se již neindikuje a raději ukončujeme těhotenství.

Plazmaferéza a intravenózní aplikace imunoglobulinu (IVIG)

U pacientek s anamnézou závažné morbidity, mortality v předchozím těhotenství z důvodu HDFN je riziko rozvoje závažné anémie u plodu již před 20. týdnem těhotenství. V tomto případě může plazmaferéza a intravenózní aplikace IVIG těhotné zajistit dostatečný hematokrit u plodu do doby, než bude IUT technicky proveditelná [150]. Dle retrospektivní studie oddálila aplikace IVIG od 13. týdne rozvoj anémie u plodu o 25 dní [154]. Různé terapeutické režimy jsou k dispozici pouze z malých souborů či ojedinělých kazuistik [106]. Dle amerických doporučení pro plazmaferézu je tato terapeutická možnost vyhrazena pouze

pro těhotenství s rizikem intrauterinního úmrtí nebo známky hydropsu u plodu do 20. týdne [120].

U aloimunizovaných těhotných žen s anamnézou hydropsu a úmrtí plodu in utero je třeba vždy postupovat v následujících těhotenství individuálně, snahou je zabránit koncepci opět RhD pozitivního plodu. Nabízí se možnost in vitro fertilizace s preimplantační genetickým testováním, v případě že potenciální biologický otec je heterozygot pro *RHD* [121], v případě že je homozygot pro *RHD* do úvahy připadá užití spermie od RhD negativního dárce, či náhradní mateřství [95].

Experimentální využití M281

V souvislosti s neinvazivní léčbou se v rámci výzkumu objevuje možnost inhibice transplacentárního přenosu imunoglobulinu IgG vyvázáním pomocí Fc receptoru, který tento transport zajišťuje. M281 je označení pro monoklonální anti Fc receptorovou protilátku, která má vysokou afinitu k Fc receptoru. M281 se jeví slibně stran léčby onemocnění v souvislosti s transplacentárním přenosem protilátky IgG [113]. V současnosti se nachází ve II. fázi klinických testů.

4.4.3 Porod a léčba novorozence s HDFN

Optimální hranice ukončení těhotenství s rizikem HDFN dle publikovaných zahraničních studií není. Na jedné straně je třeba ukončit těhotenství dříve než dojde k těžkému poškození plodu, na straně druhé plod musí být viabilní a důležitou roli hraje i zralost plicních a jaterních enzymů [86]. Dle doporučeného postupu ČGPS ČLS JEP by těhotenství mělo být ukončeno nejpozději do konce 38. týdne, porod by měl být plánován v perinatologickém centru intenzivní nebo intermediární péče. Ihned po porodu by u novorozence měl být vyšetřen z pupečníku z umbilikální žíly: krevní obraz, bilirubin, krevní skupina, přímý antiglobulinový (Coombsův) test (přítomnost mateřských aloprotilátek navázaných na antigenně komplementární erytrocyty novorozence).

Novorozenec je ohrožen jednak anémií, ale i hyperbilirubinemií [12]. Hyperbilirubinemie je bez ohledu na věk 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 klinicky patrný až při hodnotách bilirubinu nad 85 $\mu\text{mol/l}$. V případě hemolytické nemoci je novorozenecký ikterus způsoben hromaděním nekonjugovaného bilirubinu. Bilirubin byl do porodu vylučován organismem matky, po porodu vzhledem k nezralosti jater novorozence je jeho eliminace nedostatečná a pokud hladina bilirubinu překročí kritickou mez, hrozí jeho ukládání v bazálních gangliích a rozvoj jádrového ikteru. Cílem léčebných opatření je předejít takovému vzestupu hladiny bilirubinu, který by ohrozil novorozence rozvojem jádrového ikteru. Léčba hyperbilirubinemie spočívá ve fototerapii novorozence. Léčba je indikována podle grafu pro léčbu hyperbilirubinemie podle Hodra, který zohledňuje dynamiku vzestupu bilirubinu v krvi v časném postnatálním období i gestační věk dítěte a určuje potřebnou léčbu či frekvenci kontrol hladiny bilirubinu. Další možností léčby je imunoterapie, kdy profylaktické podání imunoglobulinu může zabránit rychlému vzestupu hladin bilirubinu[56]. Dále se provádí i výměnná transfúze, eliminační metoda, při které dochází k odstranění významné části bilirubinu a i části senzibilizovaných erytrocytů a protilátek podílejících se na hemolýze.

Anémie novorozence se prohlubuje, příčinou časně anemie jsou přetrvávající protilátky získané od matky, které způsobují pokračující hemolýzu. U lehčích forem je dostačující suplementace železa, ev. podání erythropoetinu, u těžších forem se podává doplňující ev. až výměnná transfúze. Po opakovaných transfúzích se objevuje i tzv. pozdní anemie, charakteristická nízkou hodnotou retikulocytů a relativně nízkou hodnotou erythropoetinu. Možnosti léčby hemolytické nemoci novorozence shrnuje tabulka 1.

Léčba anemie
<p>suplementace železem</p> <p>rekombinantní erythropoetin</p> <p>doplňující transfúze</p> <p>výměnná transfúze</p>
Léčba hyperbilirubinémie
<p>fototerapie</p> <p>imunoterapie</p> <p>výměnná transfúze</p>

Tabulka 1

Rozdělení léčby hemolytické nemoci novorozence

5. CÍLE PRÁCE

Hlavní cíle

Zhodnotit klinickou efektivitu screeningu *RHD* genotypu plodu u RhD negativních žen.

Zhodnotit laboratorní efektivitu screeningu *RHD* genotypu plodu u RhD negativních žen pomocí dvou metodik.

Vedlejší cíle

Ekonomická analýza implementace screeningu *RHD* genotypu.

Optimalizace doporučení k provádění prevence RhD aloimunizace.

6. MATERIÁL A METODIKA

V letech 2011–2015 ve Fakultní nemocnici (FN) 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 bukálních stěrů novorozenců. Všechny ženy podepsaly informovaný souhlas se zařazením do studie, který byl schválen etickou komisí FN Olomouc. 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 ve II. trimestru, medián 15. týden. Charakteristiky sledovaného souboru těhotných žen přehledně zobrazuje tabulka (Tabulka 2).

RhD negativní ženy (n)	337	
	I. trimestr 271(80 %)	II. trimestr 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/m ²)	17–36	
medián	23	
průměr	24,3	
Rasa	kavkazská	

Tabulka 2

Charakteristiky sledovaného souboru těhotných žen

Celkem bylo vyšetřeno 337 RhD negativních těhotných žen v prvním nebo druhém trimestru těhotenství.

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. Pro stanovení *RHD* genotypu plodu byly vypracovány dvě metodiky. Všechny analýzy (*RHD* genotyp ženy/plodu/novorozence) metodikou TaqMan Real Time PCR a pomocí QF-PCR byly provedeny na Ústavu lékařské genetiky (Bohmova J., Vodička R.) [14].

6.1 Izolace a zpracování materiálu

Od každé RhD negativní těhotné ženy byla odebrána krev do dvou 9 ml zkumavek označení („A“ a „B“) s EDTA (kyselina etylendiamintetraoctová). Nesrážlivá krev byla ihned po odběru umístěna na led a max. do 4 hodin po odběru zpracována. Plazma byla oddělena od buněčné frakce krve dvojí centrifugací. Vzorky jsou do dalšího zpracování zamraženy 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). 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 bukálního stěru novorozenců je extrahována pomocí QiaAmp DNA Mini Kit (Qiagen) podle instrukcí v manuálu.

6.2 TaqMan Real Time PCR

TaqMan Real Time PCR s vnitřní kontrolou amplifikace je založena na detekci exonu 7 *RHD* genu a pro vnitřní kontrolu amplifikace byla použita sekvence β -globinu. Plazmatické DNA („A“ a „B“) jsou analyzovány z každého vzorku ve dvou paralelních reakcích (každý vzorek cff DNA byl měřen 4x). Amplifikace se provádí pomocí real-time PCR systému Mx3005P (Stratagene). Pro vyhodnocení je využit software MxPro - Mx3005P v 3.00 Build 311 (Stratagene). Pro každou skupinu vzorků jsou stanoveny prahové hodnoty tzv. Ct hodnoty (počet cyklů, při kterém fluorescence přesáhne prahovou hodnotu). Před odečtením je naměřená fluorescence logaritmována.

6.3 QF-PCR

Druhou metodikou je QF-PCR s vnitřní kontrolou amplifikace pomocí kapilární elektroforézy. Pro amplifikaci a kvantifikaci multiplexu byly použity primery z exonu 7 *RHD* genu a pro vnitřní kontrolu amplifikace byly použity primery pro gonozomální sekvenční AMELX/Y. Plazmatická DNA („A“ i „B“) je analyzována ve dvou paralelních reakcích. Intenzita fluorescence a délka PCR produktů je určována pomocí kapilární elektroforézy na genetickém analyzátoru ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) s využitím polymeru POP-4 (Applied Biosystems). Každý vzorek plazmatické DNA je hodnocen při dvou podmínkách kapilární elektroforézy. Ke snímání a digitalizaci hrubých dat fluorescence je používán software ABI PRISM 310 Data Collection. K vlastní analýze snímaných dat je využíván software 310 GeneScan 3.1.2 (Applied Biosystems). Ke kvantitativním analýzám je použit parametr RFU (relativní fluorescenční jednotka) vyjádřený výškou píku.

Statistická analýza

Prediktivní síla proměnných byla kvantifikována na základě standardního souboru statistik: sensitivity, specificity, falešné pozitivivity, falešné negativivity a celkové přesnosti. Analýzy byly vypočteny pomocí SPSS 23.0.0.1 (IBM Corporation, 2015).

7. VÝSLEDKY

7.1 TaqMan Real Time PCR

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 4 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 metodiku Taq Man Real Time PCR ke stanovení *RHD* genotypu vyhodnotit jako velmi přesnou, spolehlivou a využitelnou v klinické praxi.

Výsledky a parametry screeningového testu přehledně zobrazuje schéma (Schéma 5).

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

		Novorozenec		Celkem
		<i>RHD</i> +	<i>RHD</i> -	
Plod	<i>RHD</i> +	179	2	181
	<i>RHD</i> -	4	148	152
Celkem		183	150	333

		%	95% CI (%)
Senzitivita	0,978	97,8	94,5 - 99,4
Specifická	0,987	98,7	95,3 - 99,8
Falešná pozitivita	0,013	1,3	0,2 - 4,7
Falešná negativita	0,022	2,2	0,6 - 5,5
Pozitivní prediktivní hodnota	0,989	98,9	96,1 - 99,7
Negativní prediktivní hodnota	0,974	97,4	93,4 - 99,3
Přesnost (shoda)	0,982	98,2	96,1 - 99,3
Koeficient shody (Cohenovo kappa)	0,964	p<0,0001	0,935 - 0,993

Schéma 5

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 bukalního stěru. *RHD* genotyp ženy/plodu/novorozence byl stanoven metodikou **TaqMan RealTime PCR**. Celkem se podařilo získat 333 „tripletů“ (*RHD* genotyp ženy/plodu/novorozence).

CI (confidence interval) - interval spolehlivosti.

7.2 QF-PCR

Celkem se podařilo získat k vyhodnocení 335 „tripletů“ (*RHD* genotyp ženy/plodu/novorozence). 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 2 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 metodiku QF-PCR ke stanovení *RHD* genotypu vyhodnotit jako velmi přesnou, spolehlivou a využitelnou v klinické praxi.

Výsledky a parametry screeningového testu přehledně zobrazuje schéma (Schéma 6).

RhD negativní ženy – fenotyp (n)	337
<i>RHD</i> negativní ženy – genotyp (n)	335
Selhala analýza volné fetální DNA (n)	0
Stanoven <i>RHD</i> genotyp plodu (n)	335
Stanoven <i>RHD</i> genotyp novorozence (n)	335

		Novorozenec		Celkem
		<i>RHD</i> +	<i>RHD</i> -	
Plod	<i>RHD</i> +	183	2	181
	<i>RHD</i> -	2	148	152
Celkem		185	150	335

		%	95%CI (%)
Senzitivita	0,989	98,9	96,2-99,9
Specifická	0,987	98,7	95,3-99,8
Falešná pozitivita	0,013	1,3	0,2-4,7
Falešná negativita	0,011	1,1	0,1-3,9
Pozitivní prediktivní hodnota	0,989	98,9	96,2-99,9
Negativní prediktivní hodnota	0,987	98,7	95,3-99,8
Přesnost (shoda)	0,988	98,8	97,0-99,7
Koeficient shody (Cohenovo kappa)	0,976	p<0,0001	0,952-1,000

Schéma 6

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 bukalního stěru. *RHD* genotyp ženy/plodu/novorozence byl stanoven metodikou **QF-PCR** s vnitřní kontrolou amplifikace pomocí kapilární elektroforézy. Celkem se podařilo získat 335 „tripletů“ (*RHD* genotyp ženy/plodu/novorozence).

CI (confidence interval) - interval spolehlivosti, QF-PCR (quantitative fluorescence polymerase chain reaction) - kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce.

8. DISKUZE

Dosud všechny práce týkající se vyšetření *RHD* genotypu plodu v ČR byly provedené jen na malém souboru pacientek. Vyšetření *RHD* a *RHCE* genotypu plodu z volné fetální DNA cirkulující v periferní krvi těhotných žen bylo v České republice poprvé zavedeno v roce 2005 Hromadníkovou et al. [51]. Jednalo se však jen o malý soubor 45 těhotných žen. Cílovou skupinou byly těhotné ženy s diagnostikovanou aloimunizací antigenu D, C, c, E, e, vyšetření bylo pomocí real time PCR. V případě *RHD* genotypu zaměřené na exon 7 a 10. Svobodová et al srovnává na souboru 35 těhotných žen droplet digitální PCR a qPCR, což je v současné době široce rozšířená metoda kvantifikace DNA běžně používaná. Dle výsledků je digitální PCR vyhodnocena jako přesnější metoda, avšak pracovně náročnější, se závěrem nutnosti dalších studií před zavedením metodiky do rutinní praxe [132]. Metodika užívaná ve světě je prakticky vždy založena na qPCR, dle výsledků mnohých populačních studiích je qPCR přesná s vysokou senzitivitou a využitelná v klinické praxi [2] [6][38] [74][81] [83] [112] [137] [151]. Obdobných výsledků bylo dosaženo v naší práci, obě metodiky jsou vyhodnoceny jako přesné, spolehlivé a využitelné v klinické praxi.

V zahraničních pracích byly falešně pozitivní výsledky přičítány fenotypově RhD negativním matkám, které nesou *RHD* pseudogen nebo jinou variantu a přenášejí tento gen na svůj plod [92]. *RHD* pseudogeny byly popsány u 69 % jihoafrických černochů a 24 % afroameričanů [122]. V tomto případě všech 10 exonů *RHD* genu je přítomno, ale nedochází k syntéze RhD proteinu. Závážnější jsou falešně negativní výsledky, které mohou mít negativní klinický dopad. Falešná negativita může být také způsobena nízkou hladinou cff DNA ve vzorku matky nebo s použitými laboratorními technikami [13].

Stanovení *RHD* genotypu má dvojitý klinický význam. Jednak v managementu těhotenství s rizikem rozvoje HDFN, kde u cca 500 žen ročně je diagnostikována klinicky významná aloprotilátka anti-D, vyšetřením RhD genotypu u plodu jsme schopni 40 %, cca 200 plodů vyloučit z rizika rozvoje HDFN (již uvedený obrázek 4). Druhý klinický význam spočívá ve vyšetření *RHD* genotypu plodu v rámci screeningu u RhD negativních žen, který dosud v ČR není implementován do praxe.

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 diagnostikovat cca 40 % RhD negativních

plodů, v ČR se jedná ročně o cca 5.000 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 snížení incidence hemolytické nemoci plodu a novorozence [98].

Rekombinantní forma IgG anti-D zatím není k dispozici [65]. Vzhledem k tomu, že se jedná o heterologní bílkovinu, která může vyvolat nežádoucí reakci, je nutné přistupovat k provádění prevence RhD aloimunizace obezřetně a pouze v indikovaných případech. Pokud máme k dispozici spolehlivé neinvazivní testování, aplikovat těhotné ženě zbytečně IgG anti-D je na hranici etiky [60]. V souvislosti s aplikací tohoto krevního produktu se mohou objevit nežádoucí reakce. I přes důsledná opatření není vyloučeno riziko přenosu virových onemocnění. V 80. letech bylo v souvislosti s podáním imunoglobulinu nakaženo více než 700 žen virem hepatitidy C [59]. V současné době je plasma senzibilizovaných dárců vyšetřována na HBsAg, Parvovirus B19, anti HIV a HCV protilátky. Možný je i přenos agens, na která není dosud žádné testování např. priony [124]. Dle SmPC (souhrn údajů o léčivém přípravku) registrovaných přípravků v ČR je doporučeno sledovat pacientku nejméně 20 min. 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 [131]. 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 předchozí léčbu lidským imunoglobulinem snášely [119]. Riziko anafylaktické reakce se popisuje na 1:100.000 podání [103]. Rutkowski popisuje 3 případy hypersenzitivity po podání imunoglobulinu a navrhuje vhodný management v péči o těhotné s anamnézou reakce na imunoglobulin [115]. 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 [149]. Jedná se zejména 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 3. V Dánsku a Nizozemí 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 [24][46]. V Dánsku proběhla evaluace výsledků z 31 laboratoří se závěrem, že se jedná o spolehlivý test využitelný v klinické praxi [23]. V Norsku bylo zavedeno neinvazivní stanovení do rutinního používání od září 2016. Aby se snížil počet RhD aloimunizovaných žen, odběr se provádí ve 24. týdnu těhotenství, vyšetřuje se exon 7 a 10 [126]. Rutinní užití je i ve Finsku od roku 2014, kdy cílenou profylaxi dostávají pouze ženy nesoucí RhD pozitivní plod [48]. 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 [147]. V ostatních zemích Evropy například Belgii, Irsku, Velké Británii, ČR, Francii a Německu je dostupné prenatalní vyšetření *RHD* genotypu jen v určitých regionech [21] [31] [90] [125] [142]. V USA je na trhu komerční vyšetření SensiGen RhD od firmy Sequenom [91] [16]. V Kanadě byly v roce 2017 zahájeny kroky k implementaci screeningového vyšetření *RHD* genotypu [57][35]. Dle publikovaných výsledků z Itálie detekce fetální RhD v mateřské plazmě pomocí komerčního testu s více exony (5, 7, 10 exon) je spolehlivá a přesná, s přijatelnou falešnou negativitou. Přítomnost tří prumerů *RHD* exonů zvyšuje citlivost a poskytuje možnost identifikovat varianty RhD ve smíšených etnických populacích. Doporučeno je zavedení komerčního testu do běžné klinické praxe v zemi. [84]. Dle závěrů systematické review z Německa má stanovení *RHD* genotypu plodu vysokou senzitivitu i specifitu. Doporučují ale před jeho rozsáhlou implementací do národních doporučení vyhodnotit výsledky a přínos NIPT [114]. Také dle australské studie je genotypizace *RHD* plodu vhodná, aby se zabránilo zbytečné aplikaci imunoglobulinu [43][53].

V 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. trimestr) a využít tak znalost *RHD* genotypu plodu k optimální péči o RhD negativní těhotné, což potvrzují mnohé studie [48][91][142]. Dle mnohých populačních studií stanovení *RHD* genotypu plodu je spolehlivé, přesné a využitelné v klinické praxi, což je ve shodě s našimi výsledky. [23] Z hlediska organizačního by mělo být vyšetření dostupné pro všechny RhD negativní těhotné ženy [99][134].

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
Italie	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

Tabulka 3

Screening *RHD* genotypu plodu u RhD negativních žen

Přehled zemí a publikovaných výsledků screeningu *RHD* genotypu plodu u *RHD* negativních žen v rámci strategie provádění prevence RhD aloimunizace.

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 = RealTimePCR

Ekonomická efektivita screeningové programu záleží na charakteristikách a ceně prováděného testu, úsporách v souvislosti s cílenou aplikací imunoglobulinu anti - D, načasování testování a nákladech na anti-D imunoglobulin [46].

Dle nizozemské studie ukazují výpočty, že zavedení screeningového stanovení RHD genotypu povede ke snížení používání anti-D imunoglobulinu o 24 % a současně se ani nezvýší náklady screeningového programu pokud se nebude vyšetřovat RhD fenotyp novorozence [46].

Dle výsledků francouzské multicentrické studie znalost *RHD* genotypu plodu pomocí neinvazivního vyšetření by významně zlepšilo péči o RhD negativní těhotné s malým zvýšením nákladů. Zavedení cílené profylaxe není efektivním krokem ve snižování nákladů, ve všech případech však existuje jasný klinický a etický přínos [31].

Data z Kanady již v roce 2014 podporují cílenou profylaxi aniž by byly zvýšeny náklady a bez zvýšeného rizika rozvoje aloimunizace [134].

Dle švédské analýzy screening *RHD* genotypu v I. trimestru a na základě toho cílená profylaxe imunoglobulinem vede k nižšímu riziku aloimunizace a nižším nákladům ve srovnání s rutinní aplikací imunoglobulinu G anti-D. [99].

Dle některých studií není ekonomický benefit ze zavedení cílené aplikace dle znalosti *RHD* genotypu, hlavní faktorem jsou vysoké náklady na samotný neinvazivní test. [49] [133].

V ČR, vzhledem k nízké ceně imunoglobulinu G anti-D, nemá stanovení *RHD* genotypu plodu jednoznačný ekonomický přínos. V současné době v ČR roční náklady na prevenci RhD aloimunizace činí cca 36 milionů Kč (zobrazuje tabulka 4). Při provádění cílené aplikace jsme schopni ušetřit cca 13 milionů Kč, které lze využít na screeningové stanovení *RHD* genotypu plodu. Pokud by nemělo dojít ke zvýšení ekonomických nákladů na prevenci RhD aloimunizace při zavedení screeningu, pak by cena testu neměla výrazněji překročit 800 Kč za vyšetření (zobrazuje schéma 7). Tyto výsledky jsou v souladu s publikovanou studií z UK provedené na populaci 100.000 těhotných žen. Dle doporučení je v UK možno zvolit neinvazivní stanovení *RHD* genotypu plodu, aby to však bylo efektivní je uváděná cena za vyšetření £25 [5][118]. Dle závěrů z UK jsou náklady na vyšetření srovnatelné s úsporou při použití cílené aplikace imunoglobulinu G anti D [125].

			IgG anti-D orientační cena	Náklady orientačně
Nejčastější potenciálně senzibilizující události	n/rok	RhD -/n	Kč/j	mil.Kč
Potraty	36.000	5.400	1.000	5
Invazivní výkony prenatální diagnostiky	20.000	3.000	1.000	3
Profylaktické podání 28. týden	15.000	15.000	1.000	15
Porod RhD pozitivního novorozence	10.000	10.000	1.000	10
Celkem (zaokrouhlo)		33.000		33
			RhD krevní skupina novorozence orientační cena	
			Kč/vyšetření	
Stanovení RhD krevní skupiny novorozence	15.000		200	3
Celkem (zaokrouhlo) za aplikaci IgG anti-D + stanovení RhD krevní skupiny novorozence				36

Tabulka 4

Odhadované náklady na provádění prevence RhD aloimunizace u RhD negativních žen za rok v ČR

Přibližné roční náklady činí cca 36 milionů Kč, zdroje dat k výpočtu získány z ÚZIS (Ústav zdravotnických informací a statistiky).

		<i>RHD</i> genotyp plodu POZITIVNÍ	IgG anti-D orientační cena	Náklady orientačně
Nejčastější potenciálně senzibilizující události	n/rok	n	Kč/j	mil.Kč
Potraty	36.000	3.200	1.000	3,2 *
Invazivní výkony prenatální diagnostiky	20.000	2.000	1.000	2
Profylaktické podání 28. týden	15.000	10.000	1.000	10
Porod RhD pozitivního novorozence	10.000	10.000	1.000	10
Celkem (zaokrouhleno)		23.000		23

	Náklady/mil Kč	Cena screeningového testu/Kč
Aplikace anti D RhD negativním ženám /rok	36	
Cílená aplikace RhD negativním s RhD pozitivním plodem	23	
Úspora nákladů u těhotných s RhD negativním plodem	13	
Stanovení <i>RHD</i> genotypu u 15.tis RhD negativních žen		800

Schéma 7

Odhadované náklady na provádění prevence RhD aloimunizace u RhD negativních žen s *RHD* pozitivním plodem v ČR

Přibližné roční náklady na cílenou prevenci RhD aloimunizace při znalosti *RHD* genotypu plodu jsou odhadovány cca na 23 milionů Kč, zdroje dat k výpočtu získány z ÚZIS (Ústav zdravotnických informací a statistiky). Další ušetřenou položkou je stanovení krevní skupiny RhD novorozence v případě znalosti *RHD* genotypu plodu. Orientační cena screeningového stanovení *RHD* genotypu je v podmínkách ČR cca 800 Kč.

* u časných potratů nelze stanovit *RHD* genotyp plodu, proto je prováděna prevence RhD aloimunizace u všech RhD negativních žen

9. ZÁVĚR

Klinický význam stanovení *RHD* genotypu plodu je dvojitý. V případě RhD aloimunizovaných žen znalost *RHD* genotypu plodu umožní vyhledat těhotenství RhD inkompatibilní, která jsou v riziku rozvoje HDFN. V této indikaci je již vyšetření v klinické praxi běžně využíváno. Znalost *RHD* genotypu plodu umožní vyhledat cca 300 plodů ročně, které jsou v riziku rozvoje závažné formy HDFN a jejich pravidelné sledování může vést ke snížení závažné perinatální morbidity a mortality. Další význam je v cílené prevenci rozvoje RhD aloimunizace u RhD negativních žen. S ohledem na vysokou incidenci RhD negativních jedinců (15 %) v evropské populaci je trend implementování screeningového stanovení *RHD* genotypu plodu v jednotlivých evropských zemích zjevný. Vyšetření přispívá k optimalizaci prenatalní 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. Klinický význam stanovení *RHD* genotypu plodu je jednoznačný. Imunoglobulin G anti-D je krevní produkt, vyráběný z plazmy imunizovaných dárců, objem produkce je tedy limitován a navíc zbytečná aplikace může ohrozit ženu nežádoucí reakcí, přestože jsou popisovány velmi vzácně.

Dle celosvětových populačních studií je vyšetření založeno nejčastěji na kvantitativní PCR se zaměřením na exon 5, 7 a/nebo 10. Vyšetření více *RHD* exonů (5,7, 10) zvyšuje citlivost testu a poskytuje možnost identifikovat varianty RhD ve smíšených etnických populacích [153]. Dle publikovaných dat je stanovení *RHD* genotypu vhodná screeningová metoda, s vysokou senzitivitou, specificitou, což je ve shodě i s výsledky mé práce. Stanovení *RHD* genotypu plodu s využitím exonu 7 pomocí obou metodik (TaqMan Real-time PCR i QF-PCR) je přesné a využitelné v klinické praxi.

V zemích se zavedeným screeningem je stanovení *RHD* genotypu zejména využíváno k antepartální profylaxi imunoglobulinem G anti-D ve 28. týdnu těhotenství, což dle ekonomických analýz představuje nejvyšší položku v nákladech na prevenci RhD aloimunizace v těhotenství. Zavedení screeningu *RHD* genotypu plodu v ČR je toho času ekonomicky limitováno nízkou cenou za imunoglobulin G anti-D.

Dle celosvětového trendu by zavedení screeningu *RHD* genotypu v ČR vedlo k optimalizaci provádění prevence RhD aloimunizace. Publikovaná data prokazují dostatečnou citlivost screeningového testu již na začátku těhotenství, od 10. týdne. Dle švédského modelu je pak znalost *RHD* genotypu využitelná k prevenci RhD aloimunizace již od časných stadií

těhotenství. Tento model by měl být zohledněn v případě implementace screeningu *RHD* genotypu plodu do doporučení v péči o RhD negativní ženy v ČR.

10. LITERATURA (citace uvedeny dle normy ČSN ISO 690)

1. Abbasi N, Johnson J-A, Ryan G (2017) Fetal anemia. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* 50:145–153. doi: 10.1002/uog.17555
2. Akolekar R, Finning K, Kuppusamy R, Daniels G, Nicolaides KH (2011) Fetal RHD genotyping in maternal plasma at 11-13 weeks of gestation. *Fetal Diagn Ther* 29:301–306. doi: 10.1159/000322959
3. Alberry M, Maddocks D, Avent N, Soothill PW et al. (2007) Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn* 27:415–418. doi: 10.1002/pd.1700
4. Alfirevic Z, Callaghan T (2014) Anti-RhD prophylaxis for RhD negative pregnant women. *BMJ* 349:g5437–g5437. doi: 10.1136/bmj.g5437
5. Allard S, Massey E (2018) Fetal RHD genotyping is a cost-effective option for supporting targeted anti-D prophylaxis in D-negative pregnancies. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 125:1423–1423. doi: 10.1111/1471-0528.15259
6. Arentz-Hansen H, Brurberg KG, Ormstad SS, Fure B et al. (2014) Determination of Fetal Rhesus D Status from Maternal Plasma of Rhesus Negative Women. Knowledge Centre for the Health Services at The Norwegian Institute of Public Health (NIPH), Oslo, Norway
7. Avent ND (1999) The rhesus blood group system: insights from recent advances in molecular biology. *Transfus Med Rev* 13:245–266. doi: 10.1016/s0887-7963(99)80056-x
8. Avent ND (2008) RHD genotyping from maternal plasma: guidelines and technical challenges. *Methods Mol Biol* 444:185–201. doi: 10.1007/978-1-59745-066-9_14
9. Avent ND, Reid ME (2000) The Rh blood group system: a review. *Blood* 95:375–387
10. Benn P, Cuckle H, Pergament E (2013) Non-invasive prenatal testing for aneuploidy: current status and future prospects: NIPT for aneuploidy. *Ultrasound Obstet Gynecol* 42:15–33. doi: 10.1002/uog.12513
11. Bergehella Vincenzo (2007) *Maternal-Fetal Evidence Based Guidelines (Series in Maternal-Fetal Medicine)* Informa-Healthcare Publishing 1st Edition.
12. Bhutani VK, Zipursky A, Blencowe H, Lawn JE et al. (2013) Neonatal hyperbilirubinemia and Rhesus disease of the newborn: incidence and impairment estimates for 2010 at regional and global levels. *Pediatr Res* 74 Suppl 1:86–100. doi: 10.1038/pr.2013.208
13. Bianchi DW, Avent ND, Costa J-M, van der Schoot CE (2005) Noninvasive prenatal diagnosis of fetal Rhesus D: ready for Prime(r) Time. *Obstet Gynecol* 106:841–844. doi: 10.1097/01.AOG.0000179477.59385.93

14. Böhmová J.; Vodička R.; Lubušský M., I. Holusková et al. Stanovení *RHD* genotypu plodu z plazmy periferní krve těhotné ženy a posouzení citlivosti nových diagnostických postupů pro zavedení do klinické praxe (2013) *Čes.Gynek*, 78 (1), s. 32-40
15. Böhmová J, Vodicka R, Lubusky M, Vrtel R et al. (2016) Clinical Potential of Effective Noninvasive Exclusion of KEL1-Positive Fetuses in KEL1-Negative Pregnant Women. *Fetal Diagn Ther* , 40(1) p. 48–53
16. Bombard AT, Akolekar R, Farkas DH, Nicolaides KH et al. (2011) Fetal *RHD* genotype detection from circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma in non-sensitized RhD negative women. *Prenat Diagn* 31:802–808. doi: 10.1002/pd.2770
17. Brinc D, Denomme GA, Lazarus AH (2009) Mechanisms of anti-D action in the prevention of hemolytic disease of the fetus and newborn: what can we learn from rodent models?: *Current Opinion in Hematology* 16:488–496. doi: 10.1097/MOH.0b013e32833199ed
18. Calda Pavel (2009) Příčiny, prevence a diagnostika aloimunizace v těhotenství. *Actual Gyn* 55–60
19. ČERMÁKOVÁ, Z., KOŘÍSTKA, M. MALUŠKOVÁ, A. *Imunohematologie*, Ostrava, 2008. Ostravská univerzita v Ostravě
20. ČGPS ČLS JEP (2019) Zásady dispenzární péče v těhotenství. Doporučený postup.
21. Chitty LS, Finning K, Wade A, Soothill P, Massey E et al. (2014) Diagnostic accuracy of routine antenatal determination of fetal RHD status across gestation: population based cohort study. *BMJ* 349:g5243–g5243. doi: 10.1136/bmj.g5243
22. Chitty LS, Griffin DR, Meaney C, Cole TJ et al. (2011) New aids for the non-invasive prenatal diagnosis of achondroplasia: dysmorphic features, charts of fetal size and molecular confirmation using cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Ultrasound Obstet Gynecol* 37:283–289. doi: 10.1002/uog.8893
23. Clausen FB, Barrett AN, Noninvasive Fetal RHD Genotyping EQA2017 Working Group (2019) Noninvasive fetal RHD genotyping to guide targeted anti-D prophylaxis-an external quality assessment workshop. *Vox Sang* 114:386–393. doi: 10.1111/vox.12768
24. Clausen FB, Christiansen M, Steffensen R, Dziegiel MH et al. (2012) 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* 52:752–758. doi: 10.1111/j.1537-2995.2011.03362.x
25. Contreras M (1998) The prevention of Rh haemolytic disease of the fetus and newborn-general background. *Br J Obstet Gynaecol* 105 Suppl 18:7–10. doi: 10.1111/j.1471-0528.1998.tb10285.x
26. Crowther CA, Middleton P (1997) Anti-D administration after childbirth for preventing Rhesus alloimmunisation. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. doi: 10.1002/14651858.CD000021

27. Crowther CA, Middleton P, McBain RD (2013) Anti-D administration in pregnancy for preventing Rhesus alloimmunisation. *Cochrane Database Syst Rev* CD000020. doi: 10.1002/14651858.CD000020.pub2
28. Daniels G (1995) *Human Blood Groups*. Oxford: Blackwell Science
29. Daniels G, Bromilow Imelda (2002) *Human blood groups*, 2nd ed. Oxford: Blackwell Publishing
30. Daniels G, Bromilow Imelda Essential (2009) *Guide to Blood Groups*, 2009th ed. Blackwell Publishing
31. Darlington M, Carbonne B, Mailloux A, et al the GENIFERH1 Study Group (2018) 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 and Childbirth* 18:496. doi: 10.1186/s12884-018-2114-5
32. Davey B, Szwasz A, Rychik J (2012) Diagnosis and management of heart failure in the fetus. *Minerva Pediatr* 64:471–492
33. Denomme GA, Wagner FF, Fernandes BJ, Flegel WA et al.(2005) Partial D, weak D types, and novel RHD alleles among 33,864 multiethnic patients: implications for anti-D alloimmunization and prevention. *Transfusion* 45:1554–1560. doi: 10.1111/j.1537-2995.2005.00586.x
34. Dodd JM, Andersen C, Dickinson JE, Ryan G et al. (2018) Fetal middle cerebral artery Doppler to time intrauterine transfusion in red-cell alloimmunization: a randomized trial. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* 51:306–312. doi: 10.1002/uog.18807
35. Duplantie J, Gonzales OM, Bois A, Reinharz D et al. (2013) Cost-effectiveness of the management of rh-negative pregnant women. *J Obstet Gynaecol Can* 35:730–740. doi: 10.1016/S1701-2163(15)30864-1
36. Everett TR, Chitty LS (2015) Cell-free fetal DNA: the new tool in fetal medicine. *Ultrasound Obstet Gynecol* 45:499–507. doi: 10.1002/uog.14746
37. Finn R, Clarke CA, Donohoe WTA, Kulke W et al. (1961) Experimental Studies on the Prevention of Rh Haemolytic Disease. *Br Med J* 1:1486–1490
38. Finning K, Martin P, Summers J, Daniels G et al. (2008) Effect of high throughput *RHD* typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *BMJ* 336:816–818. doi: 10.1136/bmj.39518.463206.25
39. Flegel WA, Wagner FF, Müller TH, Gassner C et al. (1998) Rh phenotype prediction by DNA typing and its application to practice. *Transfus Med* 8:281–302. doi: 10.1046/j.1365-3148.1998.00173.x
40. Fumia FD, Edelstone DI, Holzman IR (1984) Blood flow and oxygen delivery to fetal organs as functions of fetal hematocrit. *Am J Obstet Gynecol* 150:274–282. doi: 10.1016/s0002-9378(84)90365-x

41. Geifman-Holtzman O, Wojtowycz M, Kosmas E, Artal R (1997) Female alloimmunization with antibodies known to cause hemolytic disease. *Obstetrics & Gynecology* 89:272–275. doi: 10.1016/S0029-7844(96)00434-6
42. Ghesquière L, Garabedian C, Coulon C, Debarge V et al. (2018) Management of red blood cell alloimmunization in pregnancy. *J Gynecol Obstet Hum Reprod* 47:197–204. doi: 10.1016/j.jogoh.2018.02.001
43. Gordon LG, Hyland CA, Hyett JA, Gardener GJ et al. (2017) Noninvasive fetal RHD genotyping of RhD negative pregnant women for targeted anti-D therapy in Australia: A cost-effectiveness analysis. *Prenat Diagn* 37:1245–1253. doi: 10.1002/pd.5176
44. Gregg AR, Skotko BG, Benkendorf JL, Watson MS et al. (2016) Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med* 18:1056–1065. doi: 10.1038/gim.2016.97
45. Guibert J, Benachi A, Grebille A-G, Costa J-M et al. (2003) Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum: detection by real time PCR in early pregnancy after assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 18:1733–1736. doi: 10.1093/humrep/deg320
46. de Haas M, Thurik FF, van der Ploeg CPB, Ellen van der Schoot C et al. (2016) 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* 355. doi: 10.1136/bmj.i5789
47. Hadley A, Soothill P (2002) Alloimmune Disorders of Pregnancy. Anaemia, Thrombocytopenia and Neutropenia in the Fetus and Newborn. In: *Transfusion Medicine*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-3148.2002.00397.x>.
48. Haimila K, Sulin K, Kuosmanen M, Sainio S et al. (2017) 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* 96:1228–1233. doi: 10.1111/aogs.13191
49. Hawk AF, Chang EY, Shields SM, Simpson KN (2013) Costs and Clinical Outcomes of Noninvasive Fetal RhD Typing for Targeted Prophylaxis: *Obstetrics & Gynecology* 122:579–585. doi: 10.1097/AOG.0b013e31829f8814
50. Holusková I, Lubusky M., Studničková M., Procházka M. (2013) Erytrocytární aloimunizace těhotných žen, klinický význam a laboratorní diagnostika. *Čes Gynek* 78:89–99
51. Hromadnikova I, Vechetova L, Vesela K, Vlk R et al. (2005) Non-invasive fetal RHD and RHCE genotyping using real-time PCR testing of maternal plasma in RhD-negative pregnancies. *J Histochem Cytochem* 53:301–305. doi: 10.1369/jhc.4A6372.2005
52. Hyett JA, Gardener G, Stojilkovic-Mikic T, Finning KM, Martin PG, Rodeck CH, Chitty LS (2005) Reduction in diagnostic and therapeutic interventions by non-invasive

- determination of fetal sex in early pregnancy. *Prenat Diagn* 25:1111–1116. doi: 10.1002/pd.1284
53. Hyland CA, Millard GM, O'Brien H, Gardener GJ et al. (2017) Non-invasive fetal RHD genotyping for RhD negative women stratified into RHD gene deletion or variant groups: comparative accuracy using two blood collection tube types. *Pathology* 49:757–764. doi: 10.1016/j.pathol.2017.08.010
 54. Illanes S, Denbow M, Kailasam C, Finning K, Soothill PW (2007) Early detection of cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Early Hum Dev* 83:563–566. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2006.11.001
 55. Illanes S, Soothill P (2010) Management of red cell alloimmunisation in pregnancy: the non-invasive monitoring of the disease. *Prenat Diagn* 30:668–673. doi: 10.1002/pd.2551
 56. Indikace fototerapie(2010)Doporučený postup neonatologické společnosti.<http://www.neonatology.cz/Legislativa/Postupy/hyperbilirubinemie.pdf>
 57. Johnson J-A, MacDonald K, Clarke G, Skoll A (2017) No. 343-Routine Non-invasive Prenatal Prediction of Fetal RHD Genotype in Canada: The Time is Here. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada* 39:366–373. doi: 10.1016/j.jogc.2016.12.006
 58. Kawabata K, Morikawa M, Ishikawa S, Minakami H et al. (2019) Fetal middle cerebral artery peak systolic velocity as a predictor of fetal anemia in unselected women giving birth at or near term. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* 58:212–217. doi: 10.1016/j.tjog.2019.01.008
 59. Kenny-Walsh E (1999) Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. Irish Hepatology Research Group. *N Engl J Med* 340:1228–1233. doi: 10.1056/NEJM199904223401602
 60. Kent J, Farrell A-M, Soothill P (2014) 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* 14:87. doi: 10.1186/1471-2393-14-87
 61. Kinnings SL, Geis JA, Almasri E, Deciu C et al. (2015) Factors affecting levels of circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma and their implications for noninvasive prenatal testing: Factors affecting levels of ccfDNA in maternal plasma. *Prenat Diagn* 35:816–822. doi: 10.1002/pd.4625
 62. Kratochvílová T., Holusková I., Durdová V., et. al. (2016) Klinický význam neinvazivního stanovení *RHD* a *RHCE* genotypu plodu v managementu těhotenství s rizikem rozvoje hemolytické nemoci plodu a novorozence. *Postgrad.medicina* 18:362–369
 63. Kumpel B (2006) Are weak D RBCs really immunogenic? *Transfusion* 46:1061–1062. doi: 10.1111/j.1537-2995.2006.00847.x
 64. Kumpel BM (2006) On the immunologic basis of Rh immune globulin (anti-D) prophylaxis. *Transfusion* 46:1652–1656. doi: 10.1111/j.1537-2995.2006.00924_1.x

65. Kumpel BM, Saldoval R, Koeleman CAM, Wuhrer M et al. (2020) Anti-D monoclonal antibodies from 23 human and rodent cell lines display diverse IgG Fc-glycosylation profiles that determine their clinical efficacy. *Sci Rep* 10:1–14. doi: 10.1038/s41598-019-57393-9
66. Landon MB, Galan HL, Jauniaux ERM, Cahill AG et al. (2020) *Obstetrics: Normal and Problem Pregnancies E-Book*. Elsevier Health Sciences 787-789
67. Lindenburg IT, Smits-Wintjens VE, Klink JM van, Lopriore E et al. (2012) Long-term neurodevelopmental outcome after intrauterine transfusion for hemolytic disease of the fetus/newborn: the LOTUS study. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 206:141.e1-141.e8. doi: 10.1016/j.ajog.2011.09.024
68. Lindenburg ITM, Kamp IL van, Oepkes D (2014) Intrauterine Blood Transfusion: Current Indications and Associated Risks. *FDT* 36:263–271. doi: 10.1159/000362812
69. Liu L, Li K, Fu X, Chung C, Zhang K (2016) A Forward Look At Noninvasive Prenatal Testing. *Trends in Molecular Medicine* 22:958–968. doi: 10.1016/j.molmed.2016.09.008
70. Lo YM, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, Poon PM, Redman CW, Wainscoat JS (1998) Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med* 339:1734–1738. doi: 10.1056/NEJM199812103392402
71. Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Wainscoat JS et al. (1997) Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *The Lancet* 350:485–487. doi: 10.1016/S0140-6736(97)02174-0
72. Lo YMD, Tein MSC, Lau TK, Hjelm NM et al. (1998) Quantitative Analysis of Fetal DNA in Maternal Plasma and Serum: Implications for Noninvasive Prenatal Diagnosis. *The American Journal of Human Genetics* 62:768–775. doi: 10.1086/301800
73. Lo YMD, Zhang J, Leung TN, Hjelm NM et al. (1999) Rapid Clearance of Fetal DNA from Maternal Plasma. *The American Journal of Human Genetics* 64:218–224. doi: 10.1086/302205
74. Londero D, Stampalija T, Bolzicco D, De Angelis V et al. (2019) Fetal *RHD* detection from circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma: validation of a diagnostic kit using automatic extraction and frozen DNA. *Transfus Med* 29:408–414. doi: 10.1111/tme.12605
75. Lubušký, M. Význam vyšetření protilátek a krevní skupiny v těhotenství. (2015) *Čes Gynek*, 80(5), s 236–238
76. Lubusky M, Dhaifalah I, Holuskova I, Prochazka M, Vomackova K (2009) P100 The incidence of erythrocyte alloimmunization in pregnant women. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 107:S439–S439. doi: 10.1016/S0020-7292(09)61591-5
77. Lubušký, M., Procházka, M., Šimetka, O. Doporučení k provádění prevence RhD aloimunizace u RhD negativních žen. Doporučený postup ČGPS ČLS JEP. *Čes Gynek*, 2013, 78(2), s. 132–133.

78. Lubusky M., Holusková I., Procházka M., et. al, (2016) Management těhotenství s rizikem rozvoje hemolytické nemoci plodu a novorozence. *Postgrad.medicina* 18:352–356
79. Lubusky M., Holusková I., Procházka M., et. al. Management těhotenství s rizikem rozvoje hemolytické nemoci plodu a novorozence. *Doporučený postup ČGPS ČLS JEP. Čes Gynek* 2017:82
80. Lynne Uhlmann (2019) Red blood cell antigens and antibodies. *The UpToDate Database of systematic reviews* 2019
81. Lyon C, English A, Stevermer JJ (2018) PURLs: A new protocol for RhD-negative pregnant women? *J Fam Pract* 67:306–319
82. MacKenzie IZ, Bowell P, Gregory H, Entwistle CC et al. (1999) Routine antenatal Rhesus D immunoglobulin prophylaxis: the results of a prospective 10 year study. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 106:492–497. doi: 10.1111/j.1471-0528.1999.tb08304.x
83. Mackie FL, Hemming K, Allen S, Kilby MD et al. (2017) The accuracy of cell-free fetal DNA-based non-invasive prenatal testing in singleton pregnancies: a systematic review and bivariate meta-analysis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 124:32–46. doi: 10.1111/1471-0528.14050
84. Manfroi S, Calisesi C, Fagiani P, Randi V (2018) Prenatal non-invasive foetal *RHD* genotyping: diagnostic accuracy of a test as a guide for appropriate administration of antenatal anti-D immunoprophylaxis. *Blood Transfus* 16:514–524. doi: 10.2450/2018.0270-17
85. Mari G, Adrignolo A, Abuhamad AZ, Copel JA et al. (1995) Diagnosis of fetal anemia with Doppler ultrasound in the pregnancy complicated by maternal blood group immunization. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* 5:400–405. doi: 10.1046/j.1469-0705.1995.05060400.x
86. Mari G, Norton ME, Stone J, Berghella V, Schenone MH et al. (2015) Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM) Clinical Guideline #8: The fetus at risk for anemia—diagnosis and management. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 212:697–710. doi: 10.1016/j.ajog.2015.01.059
87. Markham KB, Rossi KQ, Nagaraja HN, O’Shaughnessy RW (2015) Hemolytic disease of the fetus and newborn due to multiple maternal antibodies. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 213:68.e1-68.e5. doi: 10.1016/j.ajog.2015.01.049
88. Mayne K, Bowell P, Woodward T, Sibley C, Lomas C, Tippett P (1990) Rh immunization by the partial D antigen of category DVa. *Br J Haematol* 76:537–539. doi: 10.1111/j.1365-2141.1990.tb07912.x
89. Mayne S, Parker JH, Harden TA, Dodds SD, Beale JA (1997) Rate of RhD sensitisation before and after implementation of a community based antenatal prophylaxis programme. *BMJ* 315:1588

90. Minon J-M, Gerard C, Senterre J-M, Schaaps J-P, Foidart J-M (2008) Routine fetal RHD genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium. *Transfusion* 48:373–381. doi: 10.1111/j.1537-2995.2007.01533.x
91. Moise K, Gandhi M, Boring N, Paladino T et al. (2016) Circulating Cell-Free DNA to Determine the Fetal RHD Status in All Three Trimesters of Pregnancy. *Obstetrics & Gynecology* 128:1340–1346. doi: 10.1097/AOG.0000000000001741
92. Moise KJ (2005) Red Blood Cell Alloimmunization in Pregnancy. *Seminars in Hematology* 42:169–178. doi: 10.1053/j.seminhematol.2005.04.007
93. Moise KJ, Carpenter RJ (1990) Increased severity of fetal hemolytic disease with known rhesus alloimmunization after first-trimester transcervical chorionic villus biopsy. *Fetal Diagn Ther* 5:76–78. doi: 10.1159/000263548
94. Moise, K.J. Jr (2019) Intrauterine fetal transfusion of red cells. The UpToDate Database of systematic reviews, updated 2019
95. Moise, K.J. Jr (2020) Overview of RhD alloimmunization in pregnancy. The UpToDate Database of systematic reviews, updated 2020
96. Moise KJJ Prevention of RhD alloimmunization in pregnancy -The UpToDate Database of systematic reviews, updated 2019
97. Mollison PL, Contreras M, Harvey Klein (1997) *Blood transfusion in clinical medicine*, 10th ed. Oxford: Blackwell Science
98. Neovius M, Tiblad E, Westgren M, Wikman A et al. (2016) 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* 123:1337–1346. doi: 10.1111/1471-0528.13801
99. Neovius M, Tiblad E, Westgren M, Wikman A et al. (2016) 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* 123:1337–1346. doi: 10.1111/1471-0528.13801
100. Nicolaides KH, Thilaganathan B, Rodeck CH, Mibashan RS (1988) Erythroblastosis and reticulocytosis in anemic fetuses. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 159:1063–1065. doi: 10.5555/uri:pii:0002937888904139
101. Nordvall M, Dziegiel M, Hegaard HK, Bidstrup M, Jonsbo F, Christensen B, Hedegaard M (2009) Red blood cell antibodies in pregnancy and their clinical consequences: synergistic effects of multiple specificities. *Transfusion* 49:2070–2075. doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02233.x
102. Oberhoffer R, Grab D, Keckstein J, Lang D et al.(1999) Cardiac changes in fetuses secondary to immune hemolytic anemia and their relation to hemoglobin and catecholamine concentrations in fetal blood. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* 13:396–400. doi: 10.1046/j.1469-0705.1999.13060396.x

103. O'Brien K, Siassakos D, Birchall J, Bidgood K et al. (2009) Reaction to anti-D immunoglobulin – can we manage it? *Obstet Med* 2:38–39. doi: 10.1258/om.2008.080039
104. O'Brien KL, Haspel RL, Uhl L (2014) Anti-D alloimmunization after D-incompatible platelet transfusions: a 14-year single-institution retrospective review: Anti-D After d+ apheresis plts. *Transfusion* 54:650–654. doi: 10.1111/trf.12341
105. Oepkes D, Meerman RH, Vandenbussche FPHA, Kanhai HHH et al. (1993) Ultrasonographic fetal spleen measurements in red blood cell-alloimmunized pregnancies. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 169:121–128. doi: 10.1016/0002-9378(93)90145-9
106. Papantoniou N, Sifakis S, Antsaklis A (2013) Therapeutic management of fetal anemia: review of standard practice and alternative treatment options. *J Perinat Med* 41:71–82. doi: 10.1515/jpm-2012-0093
107. PENKA, M., TESAŘOVÁ, E. (2012) *Hematologie a transfúzní lékařství II*. Praha : Grada Publishing, 2012,1.vydání
108. Pirelli KJ, Pietz BC, Johnson ST, Bellissimo DB et al (2010) Molecular determination of RHD zygosity: predicting risk of hemolytic disease of the fetus and newborn related to anti-D. *Prenat Diagn* 30:1207–1212. doi: 10.1002/pd.2652
109. Pretlove SJ, Fox CE, Khan KS, Kilby MD (2009) Noninvasive methods of detecting fetal anaemia: a systematic review and meta-analysis. *BJOG* 116:1558–1567. doi: 10.1111/j.1471-0528.2009.02255.x
110. Qiao L, Zhang Q, Liang Y, Wang T et al. (2019) Sequencing of short cfDNA fragments in NIPT improves fetal fraction with higher maternal BMI and early gestational age. *Am J Transl Res* 11:4450–4459
111. Roberts AB, Mitchell JM, Pattison NS (1989) Fetal liver length in normal and isoimmunized pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 161:42–46. doi: 10.1016/0002-9378(89)90229-9
112. Rouillac-Le Sciellour C, Puillandre P, Gillot R, Brossard Y (2004) Large-scale pre-diagnosis study of fetal RHD genotyping by PCR on plasma DNA from RhD-negative pregnant women. *Mol Diagn* 8:23–31. doi: 10.1007/BF03260044
113. Roy S, Nanovskaya T, Patrikeeva S, Ling LE et al. (2019) M281, an anti-FcRn antibody, inhibits IgG transfer in a human ex vivo placental perfusion model. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 220:498.e1-498.e9. doi: 10.1016/j.ajog.2019.02.058
114. Runkel B, Bein G, Sieben W, Flier D et al. (2020) Targeted antenatal anti-D prophylaxis for RhD-negative pregnant women: a systematic review. *BMC Pregnancy Childbirth* 20. doi: 10.1186/s12884-020-2742-4
115. Rutkowski K, Nasser SM (2014) Management of hypersensitivity reactions to anti-D immunoglobulin preparations. *Allergy* 69:1560–1563. doi: 10.1111/all.12494

116. Salomon LJ, Sotiriadis A, Wulff CB, Akolekar R et al. (2019) Risk of miscarriage following amniocentesis or chorionic villus sampling: systematic review of literature and updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. doi: 10.1002/uog.20353
117. Saltzman DH, Frigoletto FD, Harlow BL, Benacerraf B et al. (1989) Sonographic evaluation of hydrops fetalis. *Obstet Gynecol* 74:106–111
118. Saramago P, Yang H, Llewellyn A, Palmer S, Simmonds M, Griffin S (2018) High-throughput, non-invasive prenatal testing for fetal Rhesus D genotype to guide antenatal prophylaxis with anti-D immunoglobulin: a cost-effectiveness analysis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 125:1414–1422. doi: 10.1111/1471-0528.15152
119. Schatz Michael (2018) Anaphylaxis in pregnant and breastfeeding women - UpToDate. The UpToDate Database of systematic reviews 2018, updated 2018
120. Schwartz J, Padmanabhan A, Aqui N, Shaz BH et al. (2016) Guidelines on the Use of Therapeutic Apheresis in Clinical Practice—Evidence-Based Approach from the Writing Committee of the American Society for Apheresis: The Seventh Special Issue. *Journal of Clinical Apheresis* 31:149–338. doi: 10.1002/jca.21470
121. Seeho SKM, Burton G, Leigh D, Morris JM et al. (2005) The role of preimplantation genetic diagnosis in the management of severe rhesus alloimmunization: first unaffected pregnancy: case report. *Hum Reprod* 20:697–701. doi: 10.1093/humrep/deh624
122. Singleton BK, Green CA, Avent ND, Daniels G et al. (2000) The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood* 95:12–18
123. Smart E, Armstrong B (2008) Blood group systems. *ISBT Science Series* 3:68–92. doi: 10.1111/j.1751-2824.2008.00188.x
124. Smith A, Fiddler J, Walby K, Hier S (2011) Blood donation and institutional trust: risk, policy rhetoric, and the men who have sex with men lifetime deferral policy in Canada. *Can Rev Sociol* 48:369–389. doi: 10.1111/j.1755-618x.2011.01269.x
125. Soothill PW, Finning K, Latham T, Daniels G et al. (2015) Use of cffDNA to avoid administration of anti-D to pregnant women when the fetus is RhD-negative: implementation in the NHS. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 122:1682–1686. doi: 10.1111/1471-0528.13055
126. Sørensen K, Kjeldsen-Kragh J, Husby H, Akkøk ÇA (2018) Determination of fetal *RHD* type in plasma of RhD negative pregnant women. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 78:411–416. doi: 10.1080/00365513.2018.1475681
127. Sperling JD, Dahlke JD, Sutton D, Gonzalez JM, Chauhan SP (2018) Prevention of RhD Alloimmunization: A Comparison of Four National Guidelines. *Am J Perinatol* 35:110–119. doi: 10.1055/s-0037-1606609

128. Spong CY, Porter AE, Queenan JT (2001) Management of isoimmunization in the presence of multiple maternal antibodies. *Am J Obstet Gynecol* 185:481–484. doi: 10.1067/mob.2001.115999
129. Studničková Martina (2015) Spontánní antepartální RhD aloimunizace. *Čes Gynek* 80, s. 401–404
130. Studničková Martina, Lubusky Marek, Procházka Martin (2010) Možnosti stanovení fetomaternální hemoragie. *Čes Gynek* 75(5), s.443–446
131. Sulakvelidze I, Evans S, Switzer I, Dolovich J et al. (1995) Urticaria from allergy to a purified human anti-Rh antibody preparation. *Allergy* 50:981–983. doi: 10.1111/j.1398-9995.1995.tb02511.x
132. Svobodová I, Pazourková E, Hořínek A, Korabečná M et al. (2015) Performance of Droplet Digital PCR in Non-Invasive Fetal RHD Genotyping - Comparison with a Routine Real-Time PCR Based Approach. *PLoS One* 10. doi: 10.1371/journal.pone.0142572
133. Szczepura A, Osipenko L, Freeman K (2011) A new fetal RHD genotyping test: costs and benefits of mass testing to target antenatal anti-D prophylaxis in England and Wales. *BMC Pregnancy Childbirth* 11:5. doi: 10.1186/1471-2393-11-5
134. Teitelbaum L, Metcalfe A, Clarke G, Johnson JM et al. (2015) Costs and benefits of non-invasive fetal RhD determination. *Ultrasound Obstet Gynecol* 45:84–88. doi: 10.1002/uog.14723
135. Tiblad E, Kublickas M, Ajne G, Bui TH, Westgren M et al. (2011) Procedure-related complications and perinatal outcome after intrauterine transfusions in red cell alloimmunization in Stockholm. *Fetal Diagn Ther* 30:266–273. doi: 10.1159/000328683
136. Tippett P, Lomas-Francis C, Wallace M (1996) The Rh antigen D: partial D antigens and associated low incidence antigens. *Vox Sang* 70:123–131. doi: 10.1111/j.1423-0410.1996.tb01309.x
137. Tynan JA, Angkachatchai V, Ehrich M, Oeth P et al. (2011) Multiplexed analysis of circulating cell-free fetal nucleic acids for noninvasive prenatal diagnostic RHD testing. *Am J Obstet Gynecol* 204:251.e1–6. doi: 10.1016/j.ajog.2010.09.028
138. Urbaniak SJ, Greiss MA (2000) RhD haemolytic disease of the fetus and the newborn. *Blood Rev* 14:44–61. doi: 10.1054/blre.1999.0123
139. Van Kamp IL, Klumper FJCM, Oepkes D, Kanhai HHH et al. (2005) Complications of intrauterine intravascular transfusion for fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. *Am J Obstet Gynecol* 192:171–177. doi: 10.1016/j.ajog.2004.06.063
140. Verduin EP, Lindenburg IT, Smits-Wintjens VE, Brand A et al. (2010) Long-Term follow up after intra-Uterine transfusionS; the LOTUS study. *BMC Pregnancy Childbirth* 10:77. doi: 10.1186/1471-2393-10-77

141. Visser GHA, Renzo GCD, Spitalnik SL, Stones W et al. (2019) The continuing burden of Rh disease 50 years after the introduction of anti-Rh(D) immunoglobulin prophylaxis: call to action. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 221:227.e1-227.e4. doi: 10.1016/j.ajog.2019.05.019
142. Vivanti A, Benachi A, Huchet F-X, Costa J-M et al. (2016) Diagnostic accuracy of fetal rhesus D genotyping using cell-free fetal DNA during the first trimester of pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 215:606.e1-606.e5. doi: 10.1016/j.ajog.2016.06.054
143. Wang E, Batey A, Struble C, Oliphant A et al. (2013) Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenatal Diagnosis* 33:662–666. doi: 10.1002/pd.4119
144. Wataganara T, Peter I, Messerlian GM, Borgatta L, Bianchi DW (2004) Inverse Correlation Between Maternal Weight and Second Trimester Circulating Cell-Free Fetal DNA Levels: *Obstetrics & Gynecology* 104:545–550. doi: 10.1097/01.AOG.0000137352.93110.15
145. Westhoff CM (2004) The Rh blood group system in review: a new face for the next decade. *Transfusion* 44:1663–1673. doi: 10.1111/j.0041-1132.2004.04237.x
146. Whitecar PW, Moise KJ (2000) Sonographic methods to detect fetal anemia in red blood cell alloimmunization. *Obstet Gynecol Surv* 55:240–250. doi: 10.1097/00006254-200004000-00024
147. Wikman AT, Tiblad E, Karlsson A, Reilly M et al. (2012) Noninvasive Single-Exon Fetal RHD Determination in a Routine Screening Program in Early Pregnancy: *Obstetrics & Gynecology* 120:227–234. doi: 10.1097/AOG.0b013e31825d33d9
148. www.sukl.cz (2013) Souhrn údajů o přípravku - Rhesonativ
149. Yang H, Llewellyn A, Walker R, Simmonds M et al. (2019) High-throughput, non-invasive prenatal testing for fetal rhesus D status in RhD-negative women: a systematic review and meta-analysis. *BMC Medicine* 17:37. doi: 10.1186/s12916-019-1254-4
150. Yinon Y, Visser J, Kelly EN, Ryan G et al. (2010) Early intrauterine transfusion in severe red blood cell alloimmunization. *Ultrasound Obstet Gynecol* 36:601–606. doi: 10.1002/uog.7696
151. Zhu Y, Zheng Y, Li L, Zhou H, Liao X, Guo J, Yi P (2014) Diagnostic accuracy of non-invasive fetal RhD genotyping using cell-free fetal DNA: a meta analysis. *J Matern Fetal Neonatal Med* 27:1839–1844. doi: 10.3109/14767058.2014.882306
152. Zipursky A, Bhutani VK, Odame I (2018) Rhesus disease: a global prevention strategy. *Lancet Child Adolesc Health* 2:536–542. doi: 10.1016/S2352-4642(18)30071-3
153. Ziza KC, Liao AW, Dezan M, Dinardo CL, Levi JE et al. (2017) Determination of Fetal RHD Genotype Including the RHD Pseudogene in Maternal Plasma. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 31:e22052. doi: 10.1002/jcla.22052

154. Zwiers C, Kamp I van, Oepkes D, Lopriore E (2017) Intrauterine transfusion and non-invasive treatment options for hemolytic disease of the fetus and newborn – review on current management and outcome. *Expert Review of Hematology* 10:337–344. doi: 10.1080/17474086.2017.1305265

11. Seznam publikací a přednášek

11.1 Práce související s disertační prací

11.1.1 Původní vědecké publikace v daném oboru uveřejněná 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 KEL1 positive fetuses in KEL1 negative pregnant women. *Fetal Diagnosis Therapy*, 2016, 40 (1), p. 48-53 (IF-2,699)

11.1.2 Původní vědecké publikace uveřejněná v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

Kratochvilová T., Böhmová J., Durdová V., Vodička R., Holusková I., Langová K., Ľubušký Screening *RHD* genotypu plodu u RhD negativních žen, *Česká Gynekologie*, 2020, 85 (3), s. 156-163 (Screening of RHD fetal genotype in RhD negative women)

Durdová V., Böhmová J., **Kratochvilová T.**, Durdová V., Vodička R., Holusková I., Langová K., Ľubušký M. Efektivita stanovení *KEL* a *RHCE* genotypu plodu u aloimunizovaných žen, *Čes. Gynek.*, 2020, 85 (3), s. 164-173

Studničková M., Holusková I., Durdová V., **Kratochvilová T.**, Strašilová P., Marková I., Ľubušký M. Spontánní antepartální RhD aloimunizace. *Čes. Gynek.*, 2015, 80 (6), s. 401-404.

11.1.3 Přehledné vědecké práce uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

Kratochvilová T., Holusková I., Durdová V., Strašilová 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.

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. Postgrad. Med. 2016, 18 (4), s. 358-361.

11.1.4 Publikovaná abstrakta

Kratochvílová T., Durdová V., Bohmová J., Holusková I., Ľubušký M., Screening *RHD* genotypu plodu u RhD negativních žen. Moravská konference fetomaternální medicíny, Olomouc, 8.11. 2019, poster. ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

Kratochvílová T., Durdová V., Ľubušký M., Screening *RHD* genotypu plodu u RhD negativních žen, Brno, Celostátní konferenci sekce ultrazvukové diagnostiky 28.9. 2019, přednáška, ABSTRAKT

Kratochvílová T., Durdová V., Bohmová J., Holusková I., Ľubušký M., Fetal RhD genotyping in RHD negative women – cost and benefits na 18. Světovém kongresu fetální medicíny, Alicante, 25.-29.6. 2019, poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt CD)

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)

Kratochvílova 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)

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.-14.2018, poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt s. 31)

Kratochvílová T., Durdová V., Holusková I., Ľubušký 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)

Kratochvílová T., Durdová V., Holusková I., Ľubušký 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)

Doležalová T., Durdová V., Studničková M., Holusková I., Ľubušký M. Klinický význam vyšetření *RHD* genotypu plodu z periferní krve těhotné ženy. Moravská konference fetomaternální medicíny, Olomouc, 7.11.2014, poster. ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

Kratochvílová T., Ľubušký M. Klinický význam stanovení *RHD* genotypu plodu z periferní krve těhotné ženy. Symposium klinické biochemie FONS 2014, Pardubice, 22.-24.9.2014, přednáška. ABSTRAKT (Sborník abstrakt, str. 53, ISBN 978-80-87436-05-9)

Doležalová T., Bohmová J., Durdová V., Studničková M., Holusková I., Ľubušký M. Stanovení *RHD* genotypu plodu z volné fetální DNA v periferní krvi těhotné ženy. 1. společná konference ČGPS ČLS JEP a SGPS SLS, Brno, 6.-8.6.2014, poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt, s. 58)

Doležalová T., Durdová V., Studničková M., Holusková I., Ľubušký M. Klinický význam vyšetření *RHD* genotypu plodu z periferní krve těhotné ženy. 1. společná konference ČGPS ČLS JEP a SGPS SLS, Brno, 6.-8.6.2014, poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt, s. 58)

Doležalová T., Durdová V., Studničková M., Holusková I., Ľubušký M. Klinický význam vyšetření *RHD* genotypu plodu z periferní krve těhotné ženy. 31. celostátní

konference Sekce perinatální medicíny ČGPS ČLS JEP, Špindlerův Mlýn, 9.4.2014, přednáška, ABSTRAKT (Sborník abstrakt na CD)

Doležalová T., Bohmová J., Durdová V., Studničková M., Holusková I., Lubušký M. Stanovení RHD genotypu plodu z volné fetální DNA v periferní krvi těhotné ženy. Moravská konference fetomaternální medicíny, Olomouc, 7.11.2014, poster. ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

Doležalová T., Durdová V., Studničková M., Holusková I., Lubušký M. Klinický význam vyšetření RHD genotypu plodu z periferní krve těhotné ženy. Moravská konference fetomaternální medicíny, Olomouc, 7.11.2014, poster. ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

Durdová V., **Kratochvílová T.**, Böhmová J., Holusková I., Lubušký M., Assessment of the fetal *KEL* and *RHCE* genotype in alloimmunized pregnant women, na Moravské konferenci fetomaternální medicíny s mezinárodní účastí, 8.11.2019 poster. ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

Durdova V., Bohmova J., **Kratochvilova T.**, Vodicka R., Lubušký 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)

Durdová V., **Kratochvílová T.**, Böhmová J., Holusková I., Lubušký M., Clinical significance of assesment of the fetal *KEL* and *RHCE* genotype in alloimmunized pregnant women na 18. Světovém kongresu fetální medicíny, Alicante, 25.-29.6. 2019, poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt CD)

Durdova V., Bohmova J., **Kratochvilova T.**, Vodicka R., Lubušký 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., **Dolezalová T.**, Studnicková M., Lúbuský M., Marková I., Pilka R., Assessment of the fetal genotype from cell-free fetal DNA in maternal blood KEL 13th World Congress in Fetal Medicine, Nice 2014, červen, (sborník abstrakt CD)

Durdová V., Bohmová J., **Kratochvílová T.**, Holusková I., Lúbušský 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)

Sobková K., **Kratochvílová T.**, Durdová V., Lúbušský M. Management těhotenství s rizikem rozvoje závažné formy hemolytické nemoci plodu a novorozence–kazuistiky. Moravská konference fetomaternální medicíny, Olomouc, 10.11.2017, ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

Maděrková Tozzi M., **Kratochvílová T.**, Durdová V., Lúbušský M. Management těhotenství s rizikem rozvoje RhD aloimunizace u těhotné ženy-kazuistiky. Moravská konference fetomaternální medicíny, Olomouc, 10.11.2017, ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

Durdová V., Holusková I., **Kratochvílová T.**, Lúbušský M. Efektivita stanovení RHD genotypu plodu a objemu FMH v managementu prevence RhD aloimunizace. 34. Celostátní konference Perinatologie a fetomaternální medicíny s mezinárodní účastí s mezinárodní účastí, Karlovy Vary, 6.-8.4.2017, poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt s. 19)

Durdová V., Marková I., **Kratochvílová T.**, Sobek A., Holusková I., Lúbušský M. Klinický význam stanovení fetomaternální hemoragie při nitroděložním úmrtí plodu. Moravská konference fetomaternální medicíny, Olomouc, 11.11.2016, ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

Durdová V., Bohmová J., **Kratochvílová T.**, Studničková M., Holusková I., Lúbušský M. Neinvazivní stanovení KEL1 pozitivního plodu u KEL1 negativní „K“ aloimunizované těhotné ženy. Moravská konference fetomaternální medicíny, Olomouc, 6.11.2015, ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

Bohmova J., Lubusky M., Durdova V., Holuskova I., Studnickova M., **Kratochvilova T.**, Vlk R. Effective and clinically applicable non-invasive assessment of KEL1 positive fetuses in KEL1 negative "K" alloimmunized pregnant women. 25th World Congress on Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, Montreal, Canada, 11.-14.10.2015, poster. ABSTRACT (Ultrasound Obstet. Gynecol., 2015, 4ž (Suppl. 1), p. 138, ISSN 0960-7692)

Durdova V., **Kratochvilova T.**, Studnickova M., Markova I., Strasilova P., Horvathova K., Pilka R., Lubusky M. Effective and clinically applicable non-invasive assessment of KEL1 positive fetuses in KEL1 negative "K" alloimmunized pregnant women. 14th World Congress in Fetal Medicine, Crete, Greece, 21.-25.6.2015, ABSTRAKT (Sborník abstrakt CD)

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(Sborník abstrakt CD)

Studničková 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, Sborník abstrakt str. 26, ISBN 978-80-87562-33-8)

Durdová V., Bohmová J., **Kratochvílová T.**, Studničková M., Holusková I., Lubušký M. Stanovení KEL gentotypu 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, (Sborník abstrakt str. 14, ISBN 978-80-87562-33-8)

Durdová V., **Kratochvílová T.**, Marková I., Studničková M., Šopíková B., Geierová M., Lubušký M. Atypický náleznervové tkáně v dutině břišní u plodu s Downovým syndromem. 32. Celostátní konference Perinatologie a fetomaternální medicíny s mezinárodní účastí, Liberec, 17.-18.4.2015, (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 (Sborník abstrakt str. 25, ISBN 978-80-87562-33-8)

Studničková M., Holusková I., Durdová V., **Doležalová T.**, Ľubušký M. Incidence specifických klinicky významných antierytrocytárních aloprotilátek u žen v I. trimestru těhotenství. Moravská konference fetomaternální medicíny, Olomouc, 7.11.2014, 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, ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

Studničková M., Holusková I., Durdová V., **Doležalová T.**, Ľubušký M. Screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek u žen v I. trimestru těhotenství. 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. 1. společná konference ČGPS ČLS JEP a SGPS SLS, Brno, 6.-8.6.2014, (Sborník abstrakt, s. 57-58)

Studničková M., Holusková I., Durdová V., **Doležalová T.**, Ľubušký M. Incidence specifických klinicky významných antierytrocytárních aloprotilátek u žen v I. trimestru těhotenství. 31. celostátní konference Sekce perinatální medicíny ČGPS ČLS JEP, Špindlerův Mlýn, 9.4.2014, poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt na CD)

Studničková M., Holusková I., Durdová V., **Doležalová T.**, Ľubušký M. Screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek u žen v I. trimestru těhotenství. 31. celostátní konference Sekce perinatální medicíny ČGPS ČLS JEP, Špindlerův Mlýn, 9.4.2014, poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt na CD)

11.1.5 Seznam přednášek/posterů přednesených na veřejných odborných fórech

Kratochvílová T., Durdová V., Holusková I., Ľubušký M., Těhotenství s rizikem rozvoje hemolytické nemoci plodu a novorozence, Olomouc, hotel Flora, Seminář 120 let porodnice v Olomouci, 19.3. 2019, přednáška

Kratochvílová T., Durdová V., Holusková I., Ľubušký M., Ne-optimální management těhotenství s rizikem rozvoje hemolytické nemoci plodu a novorozence, Brno, Celostátní konferenci sekce ultrazvukové diagnostiky 5.-7.10.2018, přednáška

Kratochvílová T., Durdová V., Holusková I., Ľubušký M., Klinický význam neinvazivního stanovení RHD genotypu plodu v managementu těhotenství s rizikem rozvoje hemolytické nemoci plodu a novorozence“ Praha, Žižkovská věž, Symposium FETÁLNÍ MEDICÍNY, 5.9.2016, přednáška

Kratochvílová T., Durdová V., Holusková I., Ľubušký M. Prenatální péče o těhotenství s rizikem rozvoje hemolytické nemoci plodu a novorozence“ v Olomouci 13.4. 2016 na Přednáškovém večeru spolku lékařů, přednáška

11.2 Ostatní publikace

11.2.1 Přehledné vědecké práce uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

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

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

Mihál V., Malý T, Michálek, **Kratochvílová T.**, Sobková K., Michálková K. Choledochální cysta III.typu s malrotací jako příčina novorozenecké duodenální obstrukce, Pediatrie pro praxi, 2018;19(5):290-295.

11.2.2 Publikovaná abstrakta

Kratochvilova T., Durdova V., Roubalova L., Lubusky M. Maternal serum levels of PlGF/ sFlt-1 in a low-risk population of pregnant women in predicting delivery of an SGA newborn, Valeč, 36. Celostátní konference perinatologie a fetomaternální medicíny 11.-13.4.2019 poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt)

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, ABSTRAKT(www.FMMolomouc.cz)

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, Lublana, Slovenia, 25.-29.6.2017, ABSTRAKT (Sborník abstrakt CD)

Kratochvílová T., Marková I., Durdová V., Ľubušký M. Variabilita klinických projevů u Di Georgova syndromu. Moravská konference fetomaternální medicíny, Olomouc, 11.11.2016, ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

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)

Kratochvílová T., Marková I., Durdová V., Studničková M., Ľubušký M. Variability of clinical manifestation in patients with Di George's syndrome 15. Světový kongres fetální medicíny, Palma de Mallorca 2016/6, poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt CD)

Kratochvílová T., Marková I., Durdová V., Ľubušký M., Management těhotenství s atypickou vrozenou vadou urotraktu plodu. Moravská konference fetomaternální medicíny, Olomouc, 6.11.2015, poster. ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

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., Roubalová L., **Kratochvílová T.**, Ľubušký M., Maternal serum levels of PIGF and sFlt-1 in a low-risk population of pregnant women in the third trimester in predicting preeclampsia, Valeč na XXXVI. Celostátní konferenci perinatologie a fetomaternální medicíny 11.-13.4. 2019 (sborník abstrakt)

Durdova V., **Kratochvilova T.**, Roubalova L., Pilka R., Lubusky M. Combined screening for small for preeclampsia at 11–13 weeks. 16th World Congress in Fetal Medicine, Lublana, Slovenia, 25.-29.6.2017, poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt CD)

Maděrka M., Pilka R., Marek R., Köcher M., **Kratochvílová T.**, Hambálek J., Management komplikované arteriovenózní malformace v jizvě po císařském řezu. 34. celostátní konference Perinatologie a fetomaternální medicíny s mezinárodní účastí, Karlovy Vary, 6.-8.4.2017, poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt)

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 (Sborník abstrakt s. 38)

Roubalová L., **Kratochvílová T.**, Gardlo A., **Lubušký M.** Možnost využití stanovení poměru sFlt-1/PlGF v managementu těhotenství se závažnou formou preeklampsie a HELLP syndromu. Moravská konference fetomaternální medicíny, Olomouc, 9.11.2018, 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)

Roubalová L., Lubušký M., **Kratochvílová T.**, Gardlo A. Možnost využití stanovení poměru sFlt-1/PlGF v managementu těhotenství se závažnou formou preeklampsie a HELLP syndromu. 35. Celostátní konference perinatologie a fetomaternální medicíny s mezinárodní účastí, Mikulov, 12.-14.2018, poster. ABSTRAKT (Sborník abstrakt s. 35-36)

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)

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)

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, (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, (Sborník abstrakt CD)

Slunská P., Durdová V., **Kratochvilová T.**, Hostinská E., Sobek A., Marková I., Lubušký M. Abnormální nález v oblasti CNS ve III. trimestru - prognosa a management? Moravská konference fetomaternální medicíny, Olomouc, 11.11.2016, ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

Durdová V., Horváthová K., Šantavá A., Čapková P., Adamová K., Marková I., **Kratochvilová T.**, Strašilová P., Studničková M., Lubušký 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 (Sborník abstrakt na CD)

Strašilová P., Klásková E., Durdová V., Dubrava L., **Kratochvilová T.**, Marková I., Studničková M., Horváthová K., Lubušký M. Srdeční vada plodu jako první příznak systémového onemocnění těhotné ženy. Moravská konference fetomaternální medicíny, Olomouc, 6.11.2015, ABSTRAKT (www.FMMolomouc.cz)

Marková I., Durdová V., **Kratochvilová T.**, Studničková M., Šopíková B., Geierová M., Lubušký M. Dynamický prenatální vývoj artrogrypózy plodu v ultrazvukovém obraze. 32. celostátní konference Perinatologie a fetomaternální medicíny s mezinárodní účastí, Liberec, 17.-18.4.2015, ABSTRAKT (Sborník abstrakt str. 8, ISBN 978-80-87562-33-8)

11.2.3 Seznam přednášek/posterů přednesených na veřejných odborných fórech

Kratochvílová T., Marková I., Durdová V., Ľubušký M. Variabilita klinických projevů u Di Georgova syndromu“ v Brně na celostátní konferenci sekce ultrazvukové diagnostiky 7.-9.10.2016, přednáška

Kratochvílová T., Marková I., Durdová V., Ľubušký M., Managment těhotenství s atypickou vrozenou vadou urotraktu u plodu, Brno Celostátní konferenci sekce ultrazvukové diagnostiky 3.10. 2015, přednáška

12. Grantové projekty

Podané žádosti o udělení účelové podpory MZ ČR v roce 2017

Název projektu: 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 praxe

Kód žádosti: NV18-02-00273

Projekt nebyl přijat.

Podané žádosti o udělení účelové podpory MZ ČR v roce 2018

Název projektu: Stanovení cut-off hodnot poměru sFlt-1/PlGF pro vyloučení preeklampsie (PE) během druhého a třetího trimestru těhotenství a cut-off poměru sFlt-1/PlGF pro predikci porodu pro PE do 1 týdne u neselektované populace těhotných.

Kód žádosti: NV19-02-00241

Projekt nebyl přijat.

13. 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 těhotenství 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 práce bylo zhodnotit klinickou a laboratorní efektivitu screeningu *RHD* genotypu plodu u RhD negativních žen.

Materiál a metodika: V letech 2011–2015 ve Fakultní nemocnici Olomouc ve spolupráci Porodnicko-gynekologické kliniky, Ústavu lékařské genetiky a Transfúzního oddělení bylo provedeno 337 vyšetření *RHD* genotypu plodu u těhotných žen v I. a II. trimestru. Stanovení *RHD* genotypu plodu bylo hodnoceno paralelně pomocí dvou metodik QF-PCR a TaqMan Real Time PCR. Výsledek byl poté ověřen na *RHD* genotypu novorozence.

Výsledky: Obě metody vykazovaly vynikající přesnost ve stanovení *RHD* genotypu. TaqMan Real Time PCR byla senzitivita testu 97,8 %, specificita 98,7 %. QF PCR byla senzitivita testu 98,9 % a specificita 98,7 %. Obě metodiky vyšetření *RHD* genotypu jsou spolehlivé a využitelné v klinické praxi.

Závěr: Při hodnocení efektivity 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. Z medicínského hlediska je stanovení *RHD* genotypu plodu u všech RhD negativních žen na začátku těhotenství jednoznačně efektivní. Umožní diagnostikovat cca 40 % RhD negativních plodů kdy ženě není třeba podat IgG anti-D. Stanovení *RHD* genotypu plodu pomocí metodik TaqMan Real-time PCR a QF PCR genotypu plodu je využitelné v klinické praxi.

KLÍČOVÁ SLOVA

Těhotenství, RhD negativní žena, volná fetální DNA, TaqMan Real-time polymerázová řetězová reakce, *RHD* genotyp plodu, prevence RhD aloimunizace, imunglobulin (Ig) G anti-D.

14. SUMMARY

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 and QF PCR methods.

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. Determination of fetal *RHD* genotype was evaluated in parallel using two methods QF-PCR and TaqMan Real Time PCR. The result was then verified on a newborn *RHD* genotype.

Results: Both methods showed excellent accuracy in determining the *RHD* genotype. TaqMan Real Time PCR had an assay sensitivity of 97.8% and a specificity of 98.7%. QF PCR had an assay sensitivity of 98.9% and a specificity of 98.7%. Both methods of *RHD* genotype examination are reliable and usable in clinical practice.

Conclusion: 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. 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.

KEY WORDS

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.

15. PŘÍLOHY

Příloha 1

Bohmová J., Vodicka R., Lubusky M., Holusková I., Studnicková M., Kratochvilová R., Krejčířiková M., Janiková M., Durdová V., **Kratochvilová T.**, Filipová H., Dusek L., Dhaifalah I., Vomacková K., Kacerovsky M., Vrtel R. Clinical potential of effective non-invasive exclusion of KEL1 positive fetuses in KEL1 negative pregnant women. *Fetal Diagn. Ther.*, 2016, 40 (1), p. 48-53. (IF-2,699)

Příloha 2

Kratochvilová T., Böhmová J., Durdová V., Vodička R., Holusková I., Langová K., Lubušský Screening *RHD* genotypu plodu u RhD negativních žen, (Screening of RHD fetal genotype in RhD negative women), *Česká Gynekologie*, 2020, 85 (3), s. 156-163

Příloha 3

Kratochvilová T., Holusková I., Durdová V., Strašilová P., Lubušský 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. (The clinical significance of the non-invasive fetal RHD and RHCE genotype assessment in the management of pregnancies at risk of hemolytic disease of the fetus and newborn)

Příloha 4

Durdová V., Böhmová J., **Kratochvilová T.**, Durdová V., Vodička R., Holusková I., Langová K., Lubušský M. Efektivita stanovení *KEL* a *RHCE* genotypu plodu u aloimunizovaných žen, *Čes. Gynek.*, 2020, 85 (3), s. 164-173 (The effectiveness of KEL and RHCE fetal genotype assessment in alloimmunized women by minisequencing)

Příloha 5

Durdová V., Holusková I., **Kratochvilová T.**, Strašilová P., Lubušský M. Klinický význam neinvazivního stanovení *KEL* genotypu plodu v managementu těhotenství s rizikem rozvoje hemolytické nemoci plodu a novorozence. (The clinical significance of the non-invasive fetal *KEL* genotype assesment in the management of pregnancies at risk of hemolytic disease of the fetus and newborn) *Postgrad. Med.* 2016, 18 (4), s. 358-361.

Příloha 6

Studničková M., Holusková I., Durdová V., **Kratochvílová T.**, Strašilová P., Marková I., Lubušký M. Spontánní antepartální RhD aloimunizace (Spontaneous antepartal RhD alloimmunization) Čes. Gynek., 2015, 80 (6), s. 401-404.

Příloha 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 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.