

Empfehlung der DGTI-Sektion „Immunhämatologie und Immungenetik“ im Konsens mit dem DGTI-Vorstand:

Validierung von Testverfahren zur Bestimmung des fetalen *RHD*-Status aus dem Blut D negativer Frauen in der Schwangerschaft

Tobias Legler,¹ Gregor Bein,² Peter Bugert,³ Dieter Schwartz⁴

¹apl. Prof. Dr. med. Tobias Legler, Abteilung Transfusionsmedizin, Göttingen

²Prof. Dr. med. Gregor Bein, Zentrum für Transfusionsmedizin und Hämotherapie Gießen/Marburg

³apl. Prof. Dr. rer. nat. Peter Bugert, Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie, Mannheim

⁴apl. Prof. Dr. med. Dieter Schwartz, Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin, Wien

Einleitung

Nach den aktuellen Richtlinien der Bundesärztekammer zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) ist eine Anti-D Prophylaxe bei Rh negativen Frauen in der Schwangerschaft nicht notwendig, wenn der Fetus mit einem validierten Verfahren Rh negativ bestimmt wurde.¹ Medizinische Laboratorien, die ein Testverfahren zur Bestimmung des fetalen *RHD*-Status anbieten haben die Aufgabe, die Angaben des Herstellers von *In-vitro*-Diagnostika (IVD) zur Leistungsfähigkeit zu bewerten oder eine eigene Leistungsstudie durchzuführen sofern IVD aus Eigenherstellung (sog. in-house Verfahren) für die Analytik zur Anwendung kommen. Die Autoren dieses Beitrags haben sich mit der Literatur zur Leistungsbewertung von *In-vitro*-Diagnostika im Allgemeinen und mit der Literatur zu Leistungsstudien von Verfahren zur Bestimmung des fetalen *RHD*-Status auseinander gesetzt. Daraus entstand eine Empfehlung, die der Leitung von Medizinischen Laboratorien Anhaltspunkte liefert, die bei der Bewertung solcher neuer Verfahren berücksichtigt werden sollten.

Allgemeine Rechtsvorschriften zur Leistungsbewertung von IVD

IVD zur Bestimmung des fetalen *RHD*-Status aus mütterlichem Blut sind Medizinprodukte, daher sind die im Medizinproduktegesetz (MPG)² dargelegten Vorschriften zu erfüllen. Im MPG wurden die Anforderungen der Richtlinie 98/79/EG des Europäischen Parlaments und des Rates über *In-vitro*-Diagnostika in nationales Recht umgesetzt. Für die Planung, Organisation und Durchführung der Leistungsbewertungsstudie gelten die in der DIN EN 13612 genannten Anforderungen.³ Da die Stabilität der Reagenzien für eine konstante Leistungsfähigkeit von IVD von besonderer Bedeutung ist, müssen Daten zur Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien vorliegen. Bei der Erhebung dieser Daten gilt die DIN EN ISO 23640 „Haltbarkeitsprüfung von Reagenzien für *In-vitro*-diagnostische Untersuchungen“.⁴

Im Anhang II der Richtlinie 98/79/EG wird festgehalten, dass Reagenzien und Reagenzprodukte, einschließlich der entsprechenden Kalibrier- und Kontrollmaterialien, zur Bestimmung der Blutgruppen des ABO-Systems, des Rhesus-Systems (C, c, D, E, e) und des Kell-Systems besonderen Anforderungen genügen müssen.⁵ In 2002 wurden in den „Gemeinsamen Technischen Spezifikationen für *In-vitro* Diagnostika“ (GTS, Richtlinie 2002/364/EG) Anforderungen an die Chargenfreigabetests und für die Leistungsbewertung von Antikörpern zur Bestimmung von Blutgruppenantigenen erlassen.⁶ Viele kommerzielle Tests zur Bestimmung des fetalen *RHD*-Status aus mütterlichem Blut (z.B. Free DNA Fetal Kit® RhD, Institut de Biotechnologies Jacques Boy, Reims, Frankreich) oder zur molekularen Charakterisierung von D-Varianten wurden in der Vergangenheit weder entsprechend der GTS einer Leistungsstudie unterzogen, noch wurden die in den GTS dokumentierten Anforderungen an die Chargenfreigabetests angewendet.⁷ Weiterhin ist aus Publikationen erkennbar, dass in den Niederlanden und Dänemark der fetale *RHD*-Status mit in-house Verfahren ermittelt wird, die nicht im Vorfeld entsprechend der GTS validiert wurden.^{8,9,10} Die DGTI schließt sich der Auffassung des Herstellers Jacques Boy und der Kollegen im europäischen Ausland an, dass Reagenzien mit der Zweckbestimmung (intended use) „Bestimmung des fetalen *RHD*-Status aus mütterlichem Blut zur Durchführung einer gezielten präpartalen Anti-D-Prophylaxe“ nicht mit Antikörpern zur Bestimmung des Blutgruppen-Antigens D (RH1) vor einer RhD-kompatiblen Erythrozytentransfusion gleichgesetzt werden können. Daraus folgt, dass ein Hersteller dieser Reagenzien die GTS zur Planung der Leistungsbewertung berücksichtigen kann, dass jedoch aufgrund

des Probenmaterials (Blutplasma statt Vollblut), der Zielstrukturen (Nukleinsäuren statt Erythrozyten), entscheidenden Reagenzien (Oligonukleotide statt Antikörper) der unterschiedlichen Methodik (Nukleinsäureamplifikationstests statt Hämagglutinationstests) und des nicht vergleichbaren Risikoprofils andere Anforderungen an die Leistungsbewertung gestellt werden müssen.

Auf europäischer Ebene wurde im Mai 2017 eine neue „Verordnung (2017/746) des Europäischen Parlaments und des Rates über *In-vitro*-Diagnostika“ veröffentlicht,¹¹ mit der nach Übergangsfristen die Richtlinie 98/79/EG nach und nach ihre Gültigkeit verlieren wird. Entsprechend dieser Verordnung werden *In-vitro*-Diagnostika in die 4 Klassen A-D eingeteilt. Produkte, die zur Blutgruppenbestimmung verwendet werden, um die Immunkompatibilität von für die Transfusion, Transplantation oder Zellgabe bestimmtem Blut, Blutbestandteilen, Zellen, Geweben oder Organen festzustellen und zur Bestimmung von Merkmalen des Rhesus-Systems eingesetzt werden, müssen die höchsten Anforderungen der Klasse D erfüllen. Da eine pränatale Anti-D-Prophylaxe unabhängig vom fetalen RhD-Status als blugruppenverträglich betrachtet wird, wäre es falsch, die Reagenzien zur Bestimmung des fetalen RhD-Status der Klasse D zuzuordnen. *In-vitro*-Diagnostika werden der Klasse C zugeordnet wenn sie z.B. der Durchführung von Gentests dienen was auf die Bestimmung des fetalen RhD Status zutrifft.

Anhaltspunkte für den Umfang der Validierung liefert eine Empfehlung für qualitative molekularbiologische Tests, die für virologische Diagnoseverfahren veröffentlicht wurden.¹² Die Amplifikationsbedingungen wurden für 25.789 Fälle publiziert.⁸ Die Nukleinsäureextraktion sollte zur Minimierung von manuellen Fehlern mit einem automatisierten Extraktionsverfahren durchgeführt werden, das bei der Untersuchung von 1000 Proben an anderer Stelle validiert und publiziert wurde, oder im direkten Vergleich mit einem solchen Verfahren mit mindestens 100 Proben validiert wurde.^{9,10,8,13}

Diagnostische Sensitivität und Spezifität

Für Deutschland ist zu erwarten, dass bei ca. 65% der D-negativen Schwangeren ein positiver fetaler *RHD*-Status festgestellt wird und bei ca. 35% ein negativer fetaler *RHD*-Status.¹³ Aufgrund dieser Verteilung ist es vertretbar, dass die diagnostische Sensitivität und Spezifität an einem Kollektiv von D-negativen Schwangeren mit hinreichender Genauigkeit bestimmt werden, ohne eine Festlegung für die Anzahl der Fälle mit *RHD*-positiven und die Fälle mit *RHD*-negativen Feten zu treffen. Sensitivität und Spezifität werden maßgeblich von der untersuchten Zielregion beeinflusst. Die Verwendung von Tests zum Nachweis von *RHD* Exon 7 und einem weiteren *RHD* Exon erlaubt den Nachweis der meisten RhD Varianten.¹⁴ Für ein IVD wird nicht gefordert, dass der fetale RHD-Status bestimmt werden kann, wenn die Mutter Trägerin von ein oder zwei aberranten *RHD* Allelen ist, die mit dem D-negativen Phänotyp oder einer sehr schwachen D-Variante (z.B. DEL) assoziiert ist. In diesen seltenen Fällen besteht weiterhin die Möglichkeit, eine generelle präpartale Anti-D-Prophylaxe zu empfehlen. Die Berücksichtigung dieser Varianten wäre nur mit einem erheblichen zusätzliche Validierungs- und damit Kostenaufwand möglich, der für die deutsche Population beim jetzigen Stand der Technik unverhältnismäßig erscheint.

Die Gesamtprobenzahl zur Bestimmung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität ist eine wesentliche Größe jeder Leistungsbewertung. Für Anti-RH1 (Anti-D) nennen die GTS für Validierung eines neuen Produkts 3.000 Proben, für eine neue Formulierung oder bei Verwendung klar charakterisierter Reagenzien 1.000 Proben und bei Änderung des Anwendungsbereichs oder der Verwendungsart 500 Proben. Bei der Ausarbeitung der GTS ging es im Wesentlichen darum, für die Bewertung der Sicherheit von Blut- oder Organspenden hohe Anforderungen an die Richtigkeit der Analysenergebnisse von IVD zu stellen. Aus diesem Grund beschränken sich die GTS ausschließlich auf die Infektionstests für das Blutspender-Screening und die Tests zur Blutgruppenbestimmung. Bei der Leistungsbewertung von Anti-D geht es auch darum, schwache D-Varianten zu erfassen, welche nur bei einer hohen Gesamtprobenzahl zu erwarten sind. Diese hohen Anforderungen sind begründet, da eine falsch D-negative Bestimmung bei Blutspendern oder eine falsch D-positive Bestimmung bei Empfängern von Erythrozytenkonzentraten mit einer Wahrscheinlichkeit von bis zu 85% zu einer Anti-D Immunisierung führen kann.¹⁵

Ergibt die Bestimmung des fetalen *RHD*-Status aus mütterlichem Blut ein falsch *RHD*-negatives Testergebnis, hat dies die Unterlassung einer präpartalen Anti-D-Prophylaxe zur Folge. Durch die serologische Bestimmung des Rh Merkmals D beim Neugeborenen wird diese Fehlbestimmung aufgedeckt und die betreffende Mutter erhält eine postpartale Anti-D-Prophylaxe. Dieses Vorgehen führt zu einer Steigerung des Immunisierungsrisikos von ca. 0,2 – 0,4% auf ca. 1%, was deutlich geringer ist, als das Risiko einer falschen D-Bestimmung mit blutgruppenserologischen Reagenzien im Rahmen einer Erythrozytentransfusion.¹⁶ Auf Grundlage dieser Risikoabschätzung wird eine Leistungsbewertungsstudie mit 1.000 Proben als ausreichend betrachtet, wenn neue Methoden zur Bestimmung des fetalen *RHD*-Status aus mütterlichem Blut zum Einsatz kommen (s. Tabelle 1). Vor dem Hintergrund der umfangreichen Literatur zur Bestimmung des fetalen *RHD*-Status mit real-time PCR wird die Untersuchung von 100 Proben von RhD negativen Schwangeren mit diesem bereits gut validierten und publizierten Verfahren ausreichen, um eine Leistungsbewertung durchzuführen. Die Oligonukleotide und Sonden für *RHD* Exon 5 und *RHD* Exon 7 wurden in einer Multicenterstudie überprüft.¹⁷ Die Konzentration der Primer und Sonden wurden in einer früheren Studie der niederländischen Arbeitsgruppe publiziert.¹⁸

Die Qualität des Probenmaterials, das für die Validierung eingesetzt wird, sollte dem Probenmaterial ähnlich sein, mit dem zukünftig der fetale *RHD*-Status bestimmt wird. Wikmann et al. konnten in einer Untersuchung bei 4,118 Schwangerschaften zeigen, dass Proben vor der 10. Schwangerschaftswoche (SSW) gehäuft falsch negative Testergebnisse zur Folge haben.¹⁹ Weiterhin sollte spätestens in der 30. SSW ein Testergebnis für die Verabreichung der präpartalen Anti-D-Prophylaxe vorliegen. Daher sollten die Proben für die Bestimmung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität aus dem Zeitraum 10.-29. SSW stammen.

Analytische Nachweisgrenze

Zur Bestimmung der analytischen Nachweisgrenze ist ein WHO Referenzpräparat kommerziell erhältlich (code 07/222, National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Potters Bar, Hertfordshire, UK).²⁰ Dieses Material stellt wird in einer Verdünnungsreihe (Faktor 2) getestet, wobei jeder Verdünnungspunkt in 4 Replikaten untersucht werden sollte. Die Verdünnung 1:2 muss in 4 von

4 Replikaten *RHD* positive Testergebnisse liefern, das Ergebnis der weiteren Verdünnungsstufen ist Bestandteil der Validierungsunterlagen und stellt ein Maß für die Güte des Testsystems dar.

Messbereich und Linearität

Zur Bestimmung des Messbereichs und der Linearität ist das WHO Referenzpräparat nicht geeignet, da die Konzentration der *RHD* spezifischen Nukleinsäure hierfür zu niedrig ist. Ein geeignetes Probenmaterial ist *RHD* positive DNA (z.B. aus Blutleukozyten) in der Konzentration von 100 ng/ml getestet in einer Verdünnungsreihe (Verdünnungsfaktor halb-log zur Basis 10, Verdünnung in Plasma einer D-negativen Person). Jeder Verdünnungspunkt sollte in 3 Replikaten bestimmt werden. Die Konzentration 100 pg/ml sollte in allen 3 Replikaten positiv sein.

Präzision

Zur Bestimmung der testinternen (Intra-Assay) Präzision sollte ein Plasmagemisch von Schwangeren mit Rh-positiven Feten erstellt werden. Dieser kann mit Plasma von Schwangeren mit Rh-negativen Feten oder mit Plasma von D-negativen Personen verdünnt werden. Die Präzision wird in einem Testlauf mit 8 Aliquots dieses Plasmapools ermittelt.

Zur Bestimmung der laborinternen (Inter-Assay) Präzision sollte ein Plasmagemisch wie oben dargestellt hergestellt werden. Davon sollten 9 Aliquots verteilt auf 3 Testläufe an 3 verschiedenen Tagen, wenn möglich von unterschiedlichen Mitarbeiter/innen getestet werden.

Robustheit

Es gibt unterschiedliche Verfahren, die Robustheit eines Testverfahrens zu ermitteln. Diesbezügliche Verfahren können vom Labor oder vom Hersteller nach eigenem Ermessen zum Einsatz kommen. Es sollten jedoch immer Tests zur Bestimmung der Kontaminationsanfälligkeit durchgeführt werden. Diese sollten in 3 Testläufen, mit 12 Proben je Testlauf durchgeführt werden. Dabei sollten je Testlauf 6 Proben von D-negativen und 6 Proben von D-positiven Personen im Wechsel getestet werden.

Qualitätssicherung

Ein medizinisches Labor, das den fetalen *RHD*-Status aus mütterlichem Blut bestimmt, muss über ein Qualitätsmanagementsystem verfügen. Eine Chargenprüfung erfolgt mit bekannten positiv und negativ getesteten Proben nach jeder neuen Lieferung von Reagenzien. Hinweise zur Reagenzienlagerung sind publiziert.²¹ Da es sich, wie oben dargelegt, nicht um ein Produkt handelt, das weder Anhang II der Richtlinie 98/79/EG noch der Klasse D der Verordnung 2017/746 zuzuordnen ist, ist eine Chargenprüfung der Reagenzien durch eine benannte Stelle nicht erforderlich.

Präanalytik im Routinebetrieb

Die Probenentnahme für die Bestimmung des fetalen RHD-Status sollte zwischen der 20. und 27. SSW erfolgen, da für diesen Zeitraum die meiste Erfahrung vorliegt und das Ergebnis dann vor der präpartalen Anti-D Prophylaxe zwischen der 28. und 30. SSW vorliegt (s. Tabelle 2).^{8,8,19}

Der Zeitraum zwischen der Probengewinnung und der Abtrennung des Plasmas von den Blutzellen sollte so kurz wie möglich sein und 5 Tage nicht überschreiten. Für hämolytische Proben wurde eine unzureichende Sensitivität beschrieben, daher sollte vor der Nukleinsäureextraktion geprüft werden, ob das Plasma Hämolysezeichen aufweist.^{8,8,22,23}

Kontrollen im Routinebetrieb

Ein artifizielle Positivkontrolle (gespiked in Plasma) oder Plasma von D-positiven Personen, die nicht schwanger sind enthält in der Regel längere DNA-Fragmente und ist daher nur bedingt geeignet zur Kontrolle der Extraktionseffizienz im niedermolekularen Bereich (<100 bp).²⁴ Empfohlen werden kann daher die Herstellung eines Plasmapools aus Restplasma von Untersuchungsproben zur Herstellung mehrerer Aliquots, die dann als Positivkontrolle in jedem Testlauf mitgeführt werden sollten.⁸ Die Konzentration *RHD*-positiver DNA in dieser Positivkontrolle sollte in der Nähe der Nachweisgrenze liegen. Die Amplifikationssignale sind im Verlauf zu beurteilen um einen Trend hin zu einer schlechteren analytischen Sensitivität zu erkennen. Zur Kontrolle der Extraktions- und Amplifikationseffizienz sollte von jeder Probe eine Zielsequenz detektiert werden. Hierbei kann es sich um eine mütterliche oder fetale Zielsequenz oder um eine artifizielle Zielsequenz handeln, die vor der Nukleinsäureextraktion der Probe oder dem ersten Extraktionspuffer zugesetzt wurde. Zum Nachweis der Reproduzierbarkeit wird die Teilnahme an einem Ringversuch empfohlen. Sollte dieser nicht von einer nationalen Ringversuchsorganisation angeboten werden, so ist mindestens einmal jährlich ein Probentausch mit einem anderen medizinischen Labor zu empfehlen.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich bei Herrn Dr. Stefan Rauch aus Stuttgart für die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts und seine wertvollen Kommentare.

Tabelle 1: Anforderungen an die Validierung eines Tests zur Bestimmung des fetalen *RHD*-Status aus mütterlichem Blut zur Durchführung einer gezielten präpartalen Anti-D-Prophylaxe

Diagnostische Sensitivität und Spezifität	1000 Proben bei einem neuen Verfahren 100 Proben bei gut publizierten und validierten Verfahren
Anforderungen an die Validierungsproben	Plasma von D-negativen Schwangeren, entnommen zwischen der 10.-29. SSW, Beschreibung von Transportzeit und Transporttemperatur im Validierungsbericht
Analytische Nachweisgrenze	Verdünnungsreihe (Faktor 2) des WHO Referenzmaterials (NIBSC code 07/222) in 4 Replikaten, die Verdünnung 1:2 muss in 4 von 4 Bestimmungen positiv sein.
Messbereich und Linearität	100 ng/ml D-positive DNA in D-negativem Plasma, Verdünnungsreihe (halb-logarithmisch) in 3 Replikaten, die Konzentration 100 pg/ml muss in 3 von 3 Bestimmungen positiv sein.
Intra-Assay Präzision	8 Aliquots eines Plasmapools von D-negativen Schwangeren mit Rh-positiven Feten gemessen in einem Testlauf
Inter-Assay Präzision	9 Aliquots eines Plasmapools von D-negativen Schwangeren mit Rh-positiven Feten gemessen in 3 Testläufen an 3 Tagen, wenn möglich von unterschiedlichen Mitarbeiter/innen
Robustheit	3 Testläufe, 12 Proben je Testlauf, davon 6 Proben von D-positiven und 6 Proben von D-negativen Personen

Tabelle 2: Maßnahmen zur Qualitätssicherung im Routinebetrieb

Entnahmezeitpunkt	20. bis 27. Schwangerschaftswoche
Transportzeit	So kurz wie möglich, maximal 5 Tage bis zur Abtrennung des Plasmas von den Blutzellen
Ausschluss von Störfaktoren	Hämolyseprüfung vor der Nukleinsäureextraktion
Positivkontrolle (Run-Kontrolle)	1 Plasmapool von Schwangeren pro Testlauf
Negativkontrolle	1 Plasma einer D-negativen Person pro Testlauf
Extraktions-/Amplifikationskontrolle	Humane Kontrollsequenz oder artifizielle heterologe Kontrollsequenz die bei der Bearbeitung jeder Probe extrahiert und amplifiziert wird.

Literaturverzeichnis

- ¹ Bundesärztekammer im Einvernehmen mit dem Paul-Ehrlich-Institut: Richtlinie zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Richtlinie Hämotherapie), Gesamtnovelle 2017 vom 07.08.2017. <http://www.bundesaerztekammer.de/aerzte/medizin-ethik/wissenschaftlicher-beirat/veroeffentlichungen/haemotherapie-transfusionsmedizin/richtlinie/>
- ² Gesetz über Medizinprodukte (Medizinproduktegesetz - MPG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 7. August 2002 (BGBl. I S. 3146), das durch Artikel 16 des Gesetzes vom 23. Dezember 2016 (BGBl. I S. 3191) geändert worden ist.
- ³ DIN EN 13612, Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag, Berlin, August 2002
- ⁴ DIN EN ISO 23640, Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag, Berlin, Dezember 2015
- ⁵ RICHTLINIE 98/79/EG DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 27. Oktober 1998 über *In-vitro*-Diagnostika. ABL. L 331 vom 7.12.1998, S.1
- ⁶ Entscheidung der Kommission vom 7. Mai 2002 über Gemeinsame Technische Spezifikationen für In-Vitro-Diagnostika; 2002/364/EG. ABL. L 131 vom 16.5.2002, S.17
- ⁷ Rouillac-Le Sciellour C, Serazin V, Brossard Y, Oudin O, Le Van Kim C, Colin Y, Guidicelli Y, Menu M, Cartron JP: Noninvasive fetal RhD genotyping from maternal plasma. Use of a new developed free DNA fetal kit RhD. *Transfus Clin Biol* 2007;14:572–577
- ⁸ De Haas M, Thurik FF, van der Ploeg CPB et al. Sensitivity of fetal *RHD* screening for safe guidance of targeted anti-D immunoglobulin prophylaxis: prospective cohort study of a nationwide programme in the Netherlands. *BMJ* 2016;355:i5789
- ⁹ Clausen FB, Christiansen M, Steffensen R, et al. Report of the first nationally implemented clinical routine screening for fetal *RHD* in D- pregnant women to ascertain the requirement for antenatal RhD prophylaxis. *Transfusion*. 2012;52:752-8
- ¹⁰ Clausen FB, Steffensen R, Christiansen M, Rudby M, Jakobsen MA, Jakobsen TR, Krog GR, Madsen RD, Nielsen KR, Rieneck K, Sprogøe U, Homburg KM, Baech J, Dziegiel MH, Grunnet N. Routine noninvasive prenatal screening for fetal *RHD* in plasma of RhD-negative pregnant women-2 years of screening experience from Denmark. *Prenat Diagn* 2014;34:1000-5
- ¹¹ Verordnung (EU) 2017/746 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 05.04.2017 über *In-vitro*-Diagnostika und zur Aufhebung der Richtlinie 98/79/EG und des Beschlusses 2010/227/EU der Kommission. ABL. L 117 vom 05.05.2017, S.176
- ¹² Rabenau H, Kortenbusch M, Berger A, et al. Validierung von Untersuchungsverfahren im Bereich der Virusdiagnostik / Validation of virus diagnostics tests. *LaboratoriumsMedizin*, 2007;31: 41-7
- ¹³ Müller SP, Bartels I, Stein W, Emons G, Gutensohn K, Köhler M, Legler TJ. The determination of the fetal RhD status from maternal plasma for decision making on Rh prophylaxis is feasible. *Transfusion* 2008;48:2292-301.
- ¹⁴ Wagner FF, Frohmajer A, Flegel WA. RHD positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genet* 2001; 2: 10
- ¹⁵ Harvey G. Klein, David J. Anstee; Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine, 12th Edition, Wiley-Blackwell 2014, S. 188
- ¹⁶ Crowther CA, Middleton P, McBain RD. Anti-D administration in pregnancy for preventing Rhesus alloimmunisation. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013 Feb 28;(2):CD000020.
- ¹⁷ Legler TJ, Liu Z, Mavrou A, Finning K, Hromadnikova I, Galbiati S, Meaney C, Hultén MA, Crea F, Olsson ML, Maddocks DG, Huang D, Armstrong Fisher S, Sprenger-Haussels M, Ait Soussan A, van der

Schoot CE. Workshop report on the extraction of fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 2007;27:824-9.

¹⁸ Grootkerk-Tax MG, Soussan AA, de Haas M, Maaskant-van Wijk PA, van der Schoot CE: Evaluation of prenatal RhD typing strategies on cell-free fetal DNA from maternal plasma. *Transfusion* 2006; 46: 2142-2148

¹⁹ Wikman AT, Tiblad E, Karlsson A, et al. Noninvasive single-exon fetal RHD determination in a routine screening program in early pregnancy. *Obstet Gynecol* 2012; 120: 227-234

²⁰ Metcalfe P, Rigsby P, Tait E, Urbaniak S. An international reference reagent for the detection of *RHD* and *SRY* DNA in plasma

²¹ Legler TJ, Heermann KH, Liu Z, Soussan AA, and van der Schoot CE. Fetal DNA: Strategies for optimal recovery. *Methods Mol Biol.* 2008;444:209-18.

²² Müller SP, Bartels I, Stein W, Emons G, Gutensohn K, Legler TJ. Cell-free fetal DNA in specimen from pregnant women is stable up to 5 days. *Prenat Diagn* 2011; 31: 1300-1304

²³ Clausen FB, Jakobsen TR, Rieneck K, Krog GR, Nielsen LK, Tabor A, Dziegiel MH. Pre-analytical conditions in non-invasive prenatal testing of cell-free fetal RHD. *PLoS One.* 2013 Oct 18;8(10):e76990. doi: 10.1371/journal.pone.0076990. eCollection 2013.

²⁴ Chan KC, Zhang J, Hui AB, et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2004; 50: 88-92