

Diagnóstico prenatal del genotipo RhD fetal

Andrés Moreno¹, Carlos Hernán Becerra²

RESUMEN

La isoimmunización RhD puede causar enfermedad hemolítica del feto y el recién nacido si el tipo de sangre del feto es RhD positivo y el de la madre RhD negativo. A pesar de que la incidencia de isoimmunización severa ha disminuido con el uso profiláctico de inmunoglobulina anti-D durante la gestación y después del parto, la sensibilización aún ocurre en un pequeño grupo de mujeres. En dicho grupo la enfermedad por Rh continúa siendo un problema importante que puede comprometer la salud y la vida del feto o neonato. Identificar tempranamente los fetos en riesgo permite establecer el plan de seguimiento para determinar el momento de la intervención y el uso adecuado de recursos. La presente revisión tiene como fin presentar los avances actuales en diagnóstico prenatal del genotipo RhD y analizar su posible implementación como prueba de rutina. *Salud UIS 2007; 39: 175-182*

Palabras clave: Isoimmunización Rh, diagnóstico prenatal, eritroblastosis fetal, genotipo

ABSTRACT

RhD isoimmunization can cause hemolytic disease of the fetus and newborn if the fetus blood type is RhD positive and the mother's is RhD negative. Even though the incidence of severe isoimmunization has decreased with the use of prophylactic anti-D immunoglobulin during pregnancy and after delivery, sensitization still occurs in a small group of women. In such group Rh disease continues to be a significant problem which can jeopardize the fetus or neonate's health and life. Early identification of the fetuses at risk allows the establishment of a follow-up plan to determine the moment of intervention and an adequate management of resources. The present revision presents the latest advances in prenatal diagnosis of fetal RhD genotype and analyzes its possible implementation as a routine test. *Salud UIS 2007; 39: 175-182*

Keywords: Rh Isoimmunization, prenatal diagnosis, fetal erythroblastosis, genotype

INTRODUCCIÓN

La enfermedad hemolítica del feto y el recién nacido fue descrita por primera vez en un parto gemelar en 1609 por una partera francesa, Louise Borgeois: el primer gemelo era hidrópico y nació muerto, y el segundo estaba profundamente icterico y subsecuentemente murió por lo que ahora llamamos kernícterus. Las dos condiciones no volvieron a ser asociadas hasta 1932, cuando Diamond *et al.*

Demostraron que el hidrops y el kernícterus eran dos aspectos de la misma enfermedad llamada eritroblastosis fetal¹.

La identificación de la causa de la hemólisis tuvo que esperar al descubrimiento del sistema Rh en 1940 y a la posterior determinación acerca de la enfermedad hemolítica del feto y el recién nacido la cual ocurría en un feto RhD positivo concebido por una mujer RhD negativo que había sido inmunizada

-
1. Médico Interno, Universidad Industrial de Santander - Hospital Universitario de Santander, Bucaramanga, Santander, Colombia.
 2. MD. Perinatólogo, Profesor Departamento de Ginec Obstetricia, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Santander, Colombia.

Correspondencia: Andrés Moreno De Luca. Dirección: Cra. 33 # 28 - 126. Hospital Universitario de Santander. Departamento de Ginec Obstetricia. Teléfono: 6346110 ext. 333. E-mail: andresmorenodeluca@yahoo.com

Recibido: Noviembre 10 de 2006 - **Aceptado:** Abril 21 de 2008

por eritrocitos RhD positivos por vía transplacentaria en un embarazo previo².

El polipéptido RhD es una proteína integral de membrana expresada exclusivamente en eritrocitos. Durante el embarazo, pequeños volúmenes de eritrocitos fetales entran continuamente a la circulación materna. Este tráfico de eritrocitos aumenta durante el progreso de la gestación. Bowman *et al.*³ demostraron al menos 0,01 ml de células fetales en 3%, 12% y 46% de mujeres en cada trimestre de embarazo. En la mayoría de mujeres, esta carga de antígeno RhD de los eritrocitos fetales y precursores eritrocitarios no estimula el sistema inmune de la madre debido a que los eritrocitos fetales son rápidamente depurados por su sistema reticuloendotelial. Sin embargo, cuando un gran volumen de sangre fetal entra en la circulación materna su sistema inmune es estimulado y se establecen clones de linfocitos B que reconocen el antígeno RhD. La respuesta inicial es la inmunoglobulina IgM anti-D la cual permanece poco tiempo para cambiar posteriormente a la producción de IgG⁴. Los anticuerpos IgG producidos por la madre, como respuesta al antígeno fetal cruzan la placenta hacia la circulación fetal, allí se unen a los eritrocitos y los destruyen. Como consecuencia del proceso hemolítico, ocurre hematopoyesis extramedular y depuración reticuloendotelial de las células fetales sensibilizadas lo cual lleva a hepatoesplenomegalia. Mientras el hígado aumenta de tamaño, su función sintética disminuye llevando a hipoproteinemia y finalmente a ascitis, anasarca e hidrops.

En las formas más severas de la enfermedad hemolítica, la falla cardíaca congestiva y el compromiso de la circulación placentaria contribuyen a la restricción del crecimiento intrauterino y al hidrops pudiendo terminar en óbito fetal. La bilirrubina formada como resultado de la hemólisis es depurada en parte por la placenta hasta el parto, después del cual el neonato depende de su propio mecanismo hepático para metabolizar la bilirrubina. La bilirrubina no conjugada puede cruzar la barrera hemato-encefálica y ser depositada en el tallo cerebral, ganglios basales y otras regiones causando kernícterus. La neurotoxicidad de la bilirrubina puede causar alteraciones leves como hipoacusias sensoriales o graves como convulsiones, atetosis, espasticidad y muerte.

Muchos factores influyen en la posible sensibilización materna. Estos incluyen el tiempo, extensión y número de intercambios sanguíneos feto-maternos; el nivel de producción de anticuerpos en la madre; y el estado ABO de la madre y del feto. La transfusión de sangre Rh negativo y ABO incompatible termina en la destrucción de células fetales más rápida y es menos probable que se produzca

una respuesta inmune que si la transfusión de células es solamente Rh incompatible.

El desarrollo de la enfermedad hemolítica del recién nacido es determinado por el fenotipo Rh de los padres. En pocas palabras, una madre Rh negativo (dd) y un padre heterocigoto Rh positivo (Dd) u homocigoto Rh positivo (DD) pueden producir un feto en riesgo. El feto puede ser heterocigoto u homocigoto para que el RhD conduzca a la formación de anticuerpos en la madre y ser afectado por paso transplacentario de anticuerpos anti-RhD. El genotipo de los padres puede predecirse basándose en los métodos de tipificación serológica clásicos, Cc, D y Ee. Para asignar el genotipo, los resultados de las pruebas serológicas se combinan con la estimación de la incidencia de fenotipos en el grupo étnico o racial al cual pertenezcan los padres⁵.

En los casos en que el padre es heterocigoto para el RhD, conocer el RhD fetal es importante clínicamente ya que nos permite seleccionar los fetos en riesgo en los cuales podemos hacer un seguimiento adecuado y determinar el momento de la intervención. Así mismo en el grupo de fetos RhD negativo, que no está en riesgo, no son necesarios procedimientos diagnósticos ni terapéuticos posteriores lo cual permite el uso adecuado de recursos.

UTILIDADES DEL DIAGNÓSTICO PRENATAL

El 56% de la población blanca Rh positiva es heterocigoto para el antígeno RhD⁵. Cuando el padre es RhD positivo heterocigoto, hay una posibilidad de 50% de que el feto sea RhD negativo y por ende no se vea afectado. Anteriormente, se empleaba como primera medida la cordocentesis para identificar fetos RhD positivos. Dicho procedimiento se asociaba con un riesgo de 1 a 3% de pérdidas fetales y un riesgo de 40% de hemorragias feto-maternas, las cuales pueden incrementar la sensibilización. Alternativamente, se realizaban amniocentesis seriadas para medir la bilirrubina en el líquido amniótico. Este método es menos preciso, no puede distinguir un feto RhD negativo de uno RhD positivo levemente afectado, y expone a la madre de un feto RhD negativo a múltiples procedimientos invasivos⁶.

Un método temprano y seguro para determinar el Rh prenatal es útil en casos en los que la isoimmunización es un factor de riesgo y el padre aparentemente es heterocigoto debido a que conocer el Rh fetal permitiría reclasificar hasta un 25% de embarazos sensibilizados para el Rh lo cual

reduce los procedimientos invasivos y el riesgo de pérdidas fetales. En embarazos no sensibilizados se evitaría el uso de inmunoglobulina anti-RhD después de procedimientos invasivos o durante el embarazo en fetos RhD negativos. En embarazos isoinmunizados la posibilidad de conocer el Rh fetal elimina el riesgo de hemorragias feto-maternas y el incremento en la sensibilización asociado a cordocentesis o biopsias coriónicas. Esto permite un manejo del embarazo más racional, evitando procedimientos invasivos innecesarios, programando tempranamente las intervenciones terapéuticas, tratando adecuadamente la anemia fetal y desembarazando en el momento preciso. En algunos países donde la terminación del embarazo justificada médicamente es legal, conocer el Rh fetal resulta de ayuda en mujeres con historia de pérdidas fetales debidas a la isoinmunización Rh, ya que la madre podría desear terminar el embarazo si el feto es RhD positivo⁷.

MANEJO ACTUAL

El manejo de la isoinmunización RhD ha sido revolucionado por dos descubrimientos importantes. Primero, ahora es posible establecer el genotipo Rh del feto de forma no invasiva usando una muestra de sangre materna. El RhD fetal puede detectarse con 100% de exactitud usando técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)^{8,9}. El ADN fetal extraído del plasma materno es analizado para el gen RHD con técnicas de PCR basadas en la fluorescencia que son lo suficientemente sensibles para detectar el gen RHD en una sola célula. El segundo avance en el manejo es el uso de velocimetría de la arteria cerebral media para monitorizar embarazos en riesgo^{10,11}. Velocidades sistólicas pico mayores que 1,5 múltiplos de la mediana para la edad gestacional específica son predictores de anemia fetal moderada o severa¹² con sensibilidad de 100%, valor predictivo positivo 71% y una tasa de falsos positivos de 12%. Los embarazos en riesgo deben ser monitoreados semanalmente y en caso de que resulten sugestivos de anemia, se recomienda la cordocentesis y según el resultado realizar transfusión intrauterina. El parto debe ser anticipado para la semana 37-38 de gestación¹³. La vía de parto depende del manejo obstétrico estándar.

TRATAMIENTO FUTURO

Evidentemente, la inmunomodulación materna selectiva será el desarrollo más prometedor para el tratamiento de las formas severas de la enfermedad hemolítica del recién nacido. Existen en la literatura, reportes de

casos anecdóticos en donde una anticipada enfermedad hemolítica del recién nacido de tipo severo no ocurre en una gestación subsecuente aun cuando es producto del mismo padre homocigoto¹⁴. Investigaciones que usan pruebas *in vitro* para simular el sistema reticuloendotelial fetal han indicado la ausencia de fagocitosis como resultado de anticuerpos maternos dirigidos contra el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en estos casos¹⁴. Por esto parecería que anticuerpos contra el MHC de antígenos paternos que son compartidos con el feto estarían realizando un fenómeno de bloqueo.

Como base para futuras investigaciones enfocadas en la inmunomodulación materna, Moise et al. desarrollaron un modelo animal de la enfermedad hemolítica del feto y el recién nacido¹⁵.

TÉCNICAS DE GENOTIPIFICACIÓN

Líquido Amniótico

El locus Rh presente en el cromosoma 1 está compuesto por dos genes adyacentes que contienen diez exones y son altamente homólogos en sus secuencias codificantes.¹⁶ Un gen codifica los polipéptidos C/c y E/e, mientras que el otro codifica el polipéptido D. La delección de este último parece ser responsable del genotipo RhD negativo. El conocimiento de la organización del locus del gen Rh sumado a la clonación del RhCcEe^{17,18} y al ADN complementario (ADNc) del RhD¹⁹ han proporcionado los medios para determinar secuencias genómicas de RhD con reacción en cadena de la polimerasa^{19,20}. Basándose en esta información, Bennett *et al.*⁶ determinaron, por primera vez, el tipo de RhD fetal en ADN obtenido por biopsia de vellosidades coriónicas y por amniocentesis. Tomaron muestras de líquido amniótico para la tipificación del RhD fetal por PCR, y muestras de sangre fetal para la tipificación RhD por métodos serológicos con el fin de confirmar los resultados de la PCR.

Los primers A1, A2, A3 y A4 fueron diseñados para caracterizar los productos de transcripción específicos de los genes RHCE y RHD¹⁹. El primer par de primers (A1 y A2) amplifican una región de 136 pares de bases (pb) común a los genes RHCE y RhD (exón 7). El segundo par de primers (A3 y A4) amplifican una región de 186 pb específica del gen RhD (exón 10). Si el ADN es RhD negativo solamente se amplifica el producto de 136 pb, mientras que si el ADN es RhD positivo se amplifican ambos productos, el de 136 pb y el de 186 pb (Figura 1).

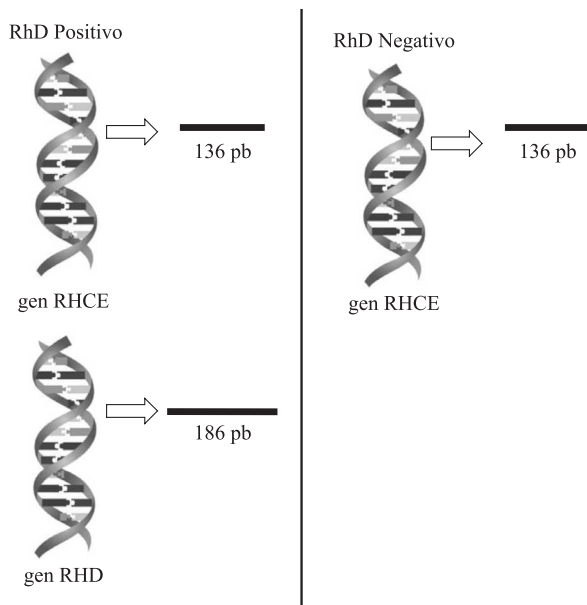


Figura 1. Principio de la amplificación de las regiones específicas RHD y RHCE del gen Rhesus.

Lighten *et al.*²¹ realizaron una serie de 134 amniocentesis. Una muestra no amplificó; todas las muestras RhD positivas se confirmaron por serología neonatal, pero dos de 36 muestras RhD negativas fueron incorrectamente clasificadas. Harding *et al.*²² examinaron 75 muestras de líquido amniótico de segundo trimestre identificando correctamente el tipo de RhD fetal en todos los casos. Sagot *et al.*²³ usaron los primers de Bennett en 21 casos sin error. Nelson *et al.*²⁴ en 87 muestras de líquido amniótico fueron incapaces de confirmar dos resultados RhD negativo con serología neonatal.

Rossiter *et al.*²⁵ analizaron 25 muestras de sangre de adulto. Sus resultados por PCR correspondieron con la prueba serológica en todos los casos. Analizaron posteriormente muestras de líquido amniótico de tres embarazos en curso encontrando que uno de los tres fetos era RhD negativo por lo cual se omitieron posteriores estudios invasivos.

Van den Veyver *et al.*²⁶ en el análisis de 107 muestras de líquido amniótico evidenciaron un error: un feto diagnosticado RhD negativo por PCR quien después fue diagnosticado RhD positivo por serología neonatal. Spence *et al.*²⁷ en su serie prospectiva de 50 fetos confirmaron por serología neonatal todos los resultados de la PCR de líquido amniótico.

Plasma Materno

Los procedimientos invasivos empleados para obtener material genético fetal para pruebas prenatales tienen un

pequeño pero significativo riesgo de aborto espontáneo²⁸. Se ha demostrado que la amniocentesis induce hemorragias feto-maternas en 17% de los casos²⁹ y se asocia a un incremento en la incidencia de inmunización materna gestacional³⁰. Por ende, en mujeres embarazadas isoimmunizadas, existe un riesgo importante de estimular la respuesta inmune hacia antígenos eritrocitarios fetales. Durante el embarazo se presenta un tráfico recíproco entre la circulación materna y fetal³¹, por lo tanto, es posible obtener células fetales de sangre periférica materna para análisis genéticos evitando poner en peligro al feto. Sin embargo, las células fetales en sangre materna son extremadamente infrecuentes^{32,33} y técnicamente difíciles de separar de su contraparte materna^{34,35}. En 1998, se demostró que el ADN fetal está presente en la fracción plasmática de la sangre materna (ADN fetal libre) en cantidades relativamente altas comparado con la fracción celular (3,4 y 6,2% en embarazo temprano y tardío respectivamente)³⁶. La detección de secuencias RhD fetales en plasma materno ha sido utilizada para predecir el RhD fetal mediante técnicas de PCR convencional³⁷⁻⁴⁰ y en tiempo real⁴¹, basándose en la teoría de que el RhD está ausente en individuos RhD negativo.

Finning *et al.*⁴² tomaron muestras sanguíneas de 137 mujeres RhD negativo con embarazos entre 8 y 42 semanas de gestación para realizar el análisis del RhD fetal por PCR en tiempo real usando ADN derivado del plasma materno. Se clasificaron correctamente el 100% de las muestras comparando los resultados con pruebas serológicas en eritrocitos fetales o PCR usando ADN fetal obtenido por procedimientos invasivos. El ADN fetal no pudo ser discriminado del ADN materno en el 15% de los fetos.

Gautier *et al.*⁴³ estudiaron 285 mujeres embarazadas RhD negativo que acudieron a consejería genética. El RhD fetal pudo ser determinado en 283 casos. En dos pacientes, el fenotipo RhD negativo no era el resultado de una delección completa del gen RHD, y por esto, el RhD fetal no pudo ser determinado. No se obtuvieron resultados falsos positivos ni falsos negativos.

Costa *et al.*⁴⁴ reportaron la determinación confiable del genotipo RhD mediante análisis de ADN fetal en suero materno durante el primer trimestre de embarazo. Obtuvieron 106 muestras las cuales fueron evaluadas usando PCR en tiempo real y los resultados fueron comparados con aquellos obtenidos más adelante en el embarazo en células de líquido amniótico o por serología del neonato. Todos los sueros de mujeres con fetos RhD positivo dieron resultados positivos para la detección del gen RHD sucediendo lo opuesto en sueros de maternas con fetos RhD negativo, obteniéndose 100% de exactitud en la genotipificación.

Frederik Banch Clausen *et al.*⁴⁵ empleando PCR en tiempo real determinaron el RhD fetal en ADN extraído de plasma materno de 56 mujeres RhD negativo con embarazos entre la 15 y 36 semanas de gestación. La predicción del RhD fetal fue 100% concordante con el RhD obtenido por serología en la semana 16 de gestación. Se encontró además que el número de copias de ADN fetal incrementa con la edad gestacional.

Rouillac-Le Scilleour *et al.*⁴⁶ describieron sus experiencias con plasma obtenido de 851 mujeres embarazadas. En el 98% (193/197) de las mujeres con fetos RhD negativo diagnosticado por medios no invasivos los resultados fueron confirmados; 4 de 197 fueron falsos negativos debido a bajas concentraciones de ADN fetal pero fueron correctamente genotipificados en una muestra repetida. El 99% (649/654) de las mujeres fueron correctamente diagnosticadas como madres de fetos RhD positivo. Tres casos falsos-positivos se debieron a la presencia de variantes del gen RHD; dos casos no pudieron ser confirmados por la ausencia de seguimiento.

Hromadnikova *et al.*⁴⁷ en 2005 evaluaron la viabilidad de la genotipificación fetal de RhD mediante análisis de ADN extraído de muestras de plasma de mujeres RhD negativo embarazadas usando PCR en tiempo real. Analizaron 45 embarazos entre 11 y 40 semanas de gestación y correlacionaron los resultados con el análisis serológico de sangre de cordón después del parto. Se realizó correctamente el análisis de la genotipificación prenatal no-invasiva de 45/45 muestras. Se concluyó en este estudio que la detección del RhD fetal es altamente precisa y permite la implementación clínica de rutina.

DIAGNÓSTICO PREIMPLANTACIÓN

El diagnóstico genético preimplantación (DGP) fue diseñado para la prevención de desórdenes genéticos en los descendientes de parejas con riesgo elevado. Desde su introducción en 1990 ha sido utilizado principalmente para la detección de desórdenes de un solo gen como la fibrosis quística, para el tamizaje de desórdenes cromosómicos y para detectar enfermedades ligadas al sexo. El DGP necesariamente involucra la fertilización *in vitro* (FIV). Después de la FIV, el embrión es evaluado para el desorden antes de que sea transferido al útero de la madre. En la enfermedad hemolítica el DGP permite evitar la incompatibilidad feto-materna de grupo sanguíneo en madres isoinmunizadas. La biopsia de una sola célula de embriones en etapa de clivaje en busca de embriones RhD negativo permite la transferencia exclusiva de productos RhD negativo al útero, evitando las potenciales

complicaciones y morbilidad de la enfermedad hemolítica del feto y el recién nacido. Seeho *et al.*⁴⁸ reportaron el primer caso de un embarazo no afectado usando DGP para la enfermedad hemolítica. La FIV y la transferencia del embrión dieron como resultado un embarazo normal y el nacimiento de una niña sana RhD negativo. Concluyeron que el DGP en parejas con un compañero masculino RhD positivo heterocigoto proporciona una opción para evitar la enfermedad hemolítica del recién nacido en madres isoinmunizadas.

FUTURAS POSIBILIDADES DIAGNÓSTICAS

Debido a que se sugiere que el riñón es uno de los mecanismos de depuración del ADN plasmático⁴⁹, Botezatu *et al.* han estudiado la posible excreción de ADN plasmático en orina⁵⁰. Lograron demostrar la presencia de ADN fetal en la orina de mujeres embarazadas de fetos masculinos. Si esta información es confirmada, podría incursionar como una nueva generación de pruebas “ultra no invasivas” para determinar el genotipo fetal. Sin embargo aún tienen que superarse cierto número de obstáculos técnicos: 1) debido a que Botezatu *et al.* utilizaron como objetivo una secuencia multi-copia cromosómica del gen Y (DYZ1)⁵⁰, aún no es clara la posibilidad de aplicar este sistema para detectar genes fetales de copia única, como el gen RHD⁵¹; y 2) la posibilidad de contaminación urinaria con ADN de espermatozoides de contactos sexuales previos debe ser tenida en cuenta en estudios futuros.

CONCLUSIONES

El descubrimiento de ADN fetal en el plasma materno ha permitido el planteamiento de nuevas y prometedoras posibilidades para la determinación prenatal no invasiva del grupo sanguíneo fetal. El genotipo RhD fetal puede ser determinado con exactitud de hasta el 100%^{42, 44, 45, 47} mediante análisis de ADN fetal presente en plasma y suero materno. Este tipo de prueba es muy útil para el manejo de embarazos de mujeres RhD negativo cuyos compañeros son heterocigotos para el gen RHD. Si la prueba indica que el feto es RhD negativo, se confirma que no está en riesgo y se elimina la necesidad de procedimientos diagnósticos o terapéuticos posteriores y la necesidad de profilaxis con inmunoglobulina anti-D. Por el contrario, si el feto resulta RhD positivo, el seguimiento y tratamiento puede ser planeado.

A pesar de que este método es realizado actualmente por un número limitado de laboratorios especializados en el

mundo, se espera un aumento en la demanda en un futuro próximo y la posibilidad de aplicarse como una de las pruebas de rutina a mujeres embarazadas RhD negativo. Estudios de este método como tamizaje de rutina se están llevando a cabo en Holanda y Francia y han sido recomendados por el Instituto Nacional de Excelencia Clínica en el Reino Unido^{43,52}.

Consideramos que para pensar en implementar este tipo de métodos diagnósticos de forma rutinaria en nuestro medio son necesarios estudios a gran escala que evalúen el aspecto económico de la genotipificación RhD fetal teniendo en cuenta la consideración costo-efectividad, la cual es particularmente importante debido a la limitada provisión de inmunoglobulina anti-D disponible.

REFERENCIAS

- Diamond LK, Blackfan KD, Baty JM. Erythroblastosis fetalis and its association with universal edema of the fetus, icterus gravis neonatorum and anemia of the newborn. *J Pediatr* 1932; 1: 269 - 09.
- Levine P, Katzin EM, Burnham L. Isoimmunization in pregnancy: its possible bearing on the etiology of erythroblastosis fetalis. *JAMA* 1941; 116: 825 - 27.
- Bowman JM, Pollock JM, Penston LE. Fetomaternal transplacental hemorrhage during pregnancy and after delivery. *Vox Sang* 1986; 51: 117 - 21.
- Kumar S, Regan F. Management of pregnancies with RhD alloimmunisation. *BMJ* 2005; 330: 1255 - 8.
- Luban NL. The new and the old--molecular diagnostics and hemolytic disease of the newborn. *N Engl J Med* 1993; 329: 658 - 60.
- Bennett PR, Le Van Kim C, Colin Y, Warwick RM, Cherif-Zahar B, Fisk NM, Cartron JP. Prenatal determination of fetal RhD type by DNA amplification. *N Engl J Med* 1993; 329: 607 - 10.
- Fisk NM, Bennett P, Warwick RM, Letsky EA, Welch R, Vaughan JI, Moore G. Clinical utility of fetal RhD typing in alloimmunized pregnancies by means of polymerase chain reaction on amniocytes or chorionic villi. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171: 50 - 4.
- Lo YM, Howell PJ, Selinger M, Mackenzie IZ, Chamberlain P, Gillmer MD, et al. Prenatal determination of fetal rhesus D status by DNA amplification of peripheral blood of rhesus-negative mothers. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 731: 229 - 36.
- Finning KM, Martin PG, Soothill PW, Avent ND, et al. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion* 2002; 42: 1079 - 85.
- McLean LK, Hedriana HL, Lanouette JM, Haesslein HC. A retrospective review of isoimmunized pregnancies managed by middle cerebral artery peak systolic velocity. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190: 1732 - 6.
- Pereira L, Jenkins TM, Berghella V. Conventional management of maternal red cell alloimmunization compared with management by Doppler assessment of middle cerebral artery peak systolic velocity. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189: 1002 - 6.
- Mari G, Deter RL, Carpenter RL, Rahman F, Zimmerman R, Moise KJ Jr, et al. Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. Collaborative Group for Doppler Assessment of the Blood Velocity in Anemic Fetuses. *N Engl J Med* 2000; 342: 9 - 14.
- Klumper FJ, van Kamp IL, Vandenbussche FP, Meerman RH, Oepkes D, Scherjon SA, et al. Benefits and risks of fetal red-cell transfusion after 32 weeks gestation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000; 92: 91 - 6.
- Neppert J, v Witzleben-Schurholz E, Zupanska B, Bartz L, Greve O, Eichler H, et al. High incidence of maternal HLAA, B and C antibodies associated with a mild course of haemolytic disease of the newborn. Group for the Study of Protective Maternal HLA Antibodies in the Clinical Course of HDN. *Eur J Haematol* 1999; 63: 120 - 5.
- Moise KJ Jr, Rodkey LS, Saade GR, Dure M, Dorman K, Mayes M, et al. An animal model for hemolytic disease of the fetus and newborn. II. Fetal effects in New Zealand rabbits. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 747 - 53.
- Colin Y, Chérif-Zahar B, Le Van Kim C, Raynal V, van Huffel V, Cartron JP. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. *Blood* 1991; 78: 2747 - 52.
- Chérif-Zahar B, Bloy C, Le Van Kim C, Blanchard D, Bailly P, Hermand P, et al. Molecular cloning and protein structure of a human group Rh polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6243 - 7.
- Avent ND, Ridgwell K, Tanner MJA, Anstee DJ. cDNA cloning of a 30 kDa erythrocyte membrane protein associated with Rh (Rhesus)-blood-group-antigen expression. *Biochem J* 1990; 271: 821 - 25.
- Le Van Kim C, Mouro I, Chérif-Zahar B, Raynal V, Cherrier C, Cartron J-P, et al. Molecular cloning and primary structure of the human blood group RhD polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10925 - 9.

20. Flegel W, Wagner F, Muller T, Gassner C. Rh phenotype prediction by DNA typing and its application to practice. *Transfus Med* 1998; 8: 281 - 02.
21. Lighten AD, Overton TG, Warwick RM, Sepulveda W, Fisk NM, Bennett PR. Accuracy of prenatal determination of RhD type status by polymerase chain reaction with amniotic cells. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 1182 - 5.
22. Harding JA, Luthy DA, Skogerboe KJ. Fetal RhD typing with polymerase chain reaction of amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172: 397.
23. Sagot P, Bonneville F, Bignon JD, Cesbron A, Boog G, Muller JY. Management of platelet and RhD maternal immunizations by PCR phenotypings after early amniocentesis. *Fetal Diagn Ther* 1995; 10: 373 - 80.
24. Nelson L, Jackson GM, Ward K. Prospective assessment of the accuracy of fetal RhD status determination from uncultured amniocytes [abstract]. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174: 338.
25. Rossiter JP, Blakemore KJ, Kickler TS, Kasch LM, Khouzami AN, Pressman EK, et al. The use of polymerase chain reaction to determine fetal RhD status. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171: 1047 - 51.
26. Van den Veyver IB, Subramanian SB, Hudson KM, Werch J, Moise KJ, Hughes MR. Prenatal diagnosis of the RhD fetal blood type on amniotic fluid by polymerase chain reaction. *Obstet Gynecol* 1996; 87: 419 - 22.
27. Spence WC, Maddalena A, Demers DB, Bick DP. Molecular analysis of the RhD genotype in fetuses at risk for RhD hemolytic disease. *Obstet Gynecol* 1995; 85: 296 - 8.
28. Wilson RD. Amniocentesis and chorionic villus sampling. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2000; 12: 81 - 6.
29. Tabor A, Bang J, Norgaard-Pedersen B. Feto-maternal haemorrhage associated with genetic amniocentesis: results of a randomized trial. *Br J Obstet Gynaecol* 1987; 94: 528 - 34.
30. Murray JC, Karp LE, Williamson RA, Cheng EY, Luthy DA. Rh isoimmunization related to amniocentesis. *Am J Med Genet* 1983; 16: 527 - 34.
31. Lo YM, Lo Es, Watson N, et al. Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications. *Blood* 1996; 88: 4390 - 5.
32. Bischoff FZ, Hahn S, Johnson KL, Simpson JL, Bianchi DW, Lewis DE, Weber WD, Klinger K, Elias S, Jackson LG, Evans MI, Holzgreve W, de la Cruz F. Intact fetal cells in maternal plasma: are they really there? *Lancet* 2003; 361: 139 - 140.
33. Sohda S, Arinami T, Hamada H, Nakauchi H, Hamaguchi H, Kubo T. The proportion of fetal nucleated red blood cells in maternal blood: estimation by FACS analysis. *Prenat Diagn* 1997; 17: 743 - 752.
34. Bianchi DW, Williams JM, Sullivan LM, et al. PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *AM J Hum Genet* 1997; 61: 822 - 9.
35. Little MT, Langlois S, Douglas Wilson R, Lansdorp P. Frequency of fetal cells in sorted subpopulations of nucleated erythroid and CD34+ hematopoietic progenitor cells from maternal peripheral blood. *Blood* 1997; 89: 2347 - 58.
36. Lo YM, Tein MS, Lau TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 768 - 75.
37. Faas BH, Beuling EA, Christiaens GC, von dem Borne AE, van der Schoot CE. Detection of fetal RHD-specific sequences in maternal plasma. *Lancet* 1998; 352: 1196.
38. Avent ND, Finning KM, Martin PG, Soothil PW. Prenatal determination of fetal blood group status. *Vox Sang* 2000; 78: 155 - 62.
39. Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. Detection of fetal Rhesus D and sex using fetal DNA from maternal plasma by multiplex polymerase chain reaction. *Br J Obstet Gynaecol* 2000; 107: 766 - 9.
40. Nelson M, Eagle C, Langshaw M, et al. Genotyping fetal DNA by non-invasive means: extraction from maternal plasma. *Vox Sang* 2001; 80: 112 - 6.
41. Lo YM, Magnus Hjelm N, Fidler C, et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med* 1998; 399: 1734 - 8.
42. Finning KM, Martin PG, Soothill PW, Avent ND. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion* 2002; 42: 1079 - 85.
43. Gautier E, Benachi A, Giovannardi Y, Ernault P, Olivi M, Gaillon T, Costa JM. Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: a two-year experience. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192: 666 - 9.
44. Costa JM, Giovannardi Y, Ernault P, Lohmann L, Nataf V, El Halali N, Gautier E. Fetal RHD genotyping in maternal serum during the first trimester of pregnancy. *Br J Haematol* 2002; 119: 255 - 60.
45. Clausen FB, Krog GR, Rieneck K, Nielsen LK, Lundquist R, Finning K, Dickmeiss E, Hedegaard

- M, Dziegiel MH. Reliable test for prenatal prediction of fetal RhD type using maternal plasma from RhD negative women. *Prenat Diagn* 2005; 25: 1040 - 4.
46. Rouillac-Le Sciellour C, Puillandre P, Gillot R, Baulard C, Metral S, Le Van Kim C, et al . Large-scale pre-diagnosis study of fetal RHD genotyping by PCR on plasma DNA from RhD-negative pregnant women. *Mol Diagn* 2004; 8: 23 - 31.
47. Hromadnikova I, Vechetova L, Vesela K, Benesova B, Doucha J, Vlk R. Non-invasive fetal RHD and RHCE genotyping using real-time PCR testing of maternal plasma in RhD-negative pregnancies. *J Histochem Cytochem* 2005; 53: 301 - 5.
48. Seeho SK, Burton G, Leigh D, Marshall JT, Persson JW, Morris JM. The role of preimplantation genetic diagnosis in the management of severe rhesus alloimmunization: first unaffected pregnancy: case report. *Hum Reprod* 2005; 20: 697 – 701.
49. Tsumita T, Iwanaga M. Fate of injected deoxyribonucleic acid in mice. *Nature* 1963; 198: 1088 - 9.
50. Botezatu I, Serdyuk O, Potapova G, Shelepov V, Alechina R, Molyaka Y, et al. Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism. *Clin Chem* 2000; 46: 1078 - 84.
51. Lo YMD. Molecular testing of urine: catching DNA on the way out. *Clin Chem* 2000; 46: 1039 - 40.
52. Daniels G, Finning K, Martin P, Soothill P. Fetal blood group genotyping from DNA from maternal plasma: an important advance in the management and prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn. *Vox Sang* 2004; 87: 225 - 32.