

ISABELA NELLY MACHADO

**GENOTIPAGEM *RHD* FETAL ATRAVÉS
DA ANÁLISE DO PLASMA MATERNO**

Dissertação de Mestrado

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Barini
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lilian Maria de Castilho**

**UNICAMP
2004**

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÕES

ISABELA NELLY MACHADO

**GENOTIPAGEM *RHD* FETAL ATRAVÉS
DA ANÁLISE DO PLASMA MATERNO**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de
Mestre em Tocoginecologia, área de
Tocoginecologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Barini
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lilian Maria de Castilho

UNICAMP
2004

UNIDADE	48
Nº CHAMADA	41/UNICAMP
	M18g
V	EX
TOMBO BC	69674
PROC.	16.227-04
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	27/12/04
Nº CPD	

B.b Id 330840

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

M18g

Machado, Isabela Nelly

Genotipagem *RHD* fetal através da análise do plasma materno / Isabela Nelly Machado. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientadores : Ricardo Barini, Lílian Maria de Castilho

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Diagnóstico Pré-Natal. 2. Eritroblastose fetal. 3. Isoimunização RH. I. Ricardo Barini. II. Lílian Maria de Castilho. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: ISABELA NELLY MACHADO

Orientador: Prof. Dr. RICARDO BARINI

Co-Orientadora: Profª. Drª. LILIAN MARIA DE CASTILHO

Membros:

1.

2.

3.

**Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

Data: 11/08/2004

068671.008

Dedico este trabalho...

*... Aos meus pais, **Cirilo e Marcília**,
verdadeiros responsáveis pela minha formação em caráter,
transmitiram-me os dois maiores dons:
a vida e a fé.*

*...Aos meus irmãos, **Daniela, Rafaela e Thales**,
meus sobrinhos, **Laura e Henrique**,
meus cunhados, **César e Juliano**,
fontes de estímulo e amor, alicerces de minha vida:
nada seria possível sem vocês.*

*...Ao **Luiz**,
presença marcante na minha caminhada até aqui:
amor transformado em chama de saudade eterna.*

*...Ao **Arthur**,
pela intensidade de sentimentos que transformaram a minha vida:
verdadeiro dono do meu coração.*

Agradecimentos

Este trabalho é resultado do esforço de inúmeras pessoas, não caberiam todas nestas páginas que se seguem. Dentre elas, gostaria de agradecer de maneira especial e sincera:

*Ao **Professor Dr. Ricardo Barini**, grande amigo, orientador e “maestro” em todas as etapas que percorri nesta busca de identidade e maturidade acadêmico-científica, por ter acreditado e me dado espaço.*

*À **Professora Dra. Lillian Castilho**, grande estudiosa, exemplo de dedicação à vida científica e colecionadora de uma inigualável experiência em Biologia Molecular de Grupos Sangüíneos, por ter me “adotado” no seu laboratório e me conduzido pacientemente pelos caminhos da biologia molecular, e principalmente, pelo carinho e confiança que se tornaram minha fonte de inspiração.*

*Ao **Professor Dr. Jordão Pellegrino Jr.**, com participação integral neste projeto, presença carinhosa e refinada inteligência nos momentos mais adversos e inesperados, pelo apoio constante e pelas sugestões oportunas e preciosas.*

*Ao **Professor Dr. Guilherme Ceccatti**, grande mestre da Obstetrícia e da Epidemiologia, com vasta cultura e experiência, pela simplicidade com que transforma a pesquisa em uma atividade prazerosa e pela contribuição inesgotável na fase de qualificação.*

*Aos **professores da Pós Graduação** do Departamento de Tocoginecologia da FCM-UNICAMP, que souberam transmitir muito mais que conhecimento: a sabedoria científica.*

*À **Professora Dra. Carmem Bertuzzo**, pela invejável didática com que me ensinou os fundamentos básicos da genética molecular.*

Aos inesquecíveis colegas da Pós Graduação, pela harmonia, amizade, respeito, carinho, pela força nos momentos difíceis, pela torcida pelo sucesso mútuo, pelos lanches vespertinos e por participarem diretamente da decisão mais importante da minha vida acadêmica.

*À **Ártemis Rodrigues e Karina Rosa**, pelo apoio desinteressado nos passos iniciais deste projeto, pelo companheirismo e por tudo que vivemos e vivenciamos juntas.*

*À **Guta** (Hospital Vera Cruz), **Renata** (PA- CAISM) e às **funcionárias do PNE-CAISM**, pela ajuda na coleta das amostras sanguíneas.*

*Ao **Dr. Kleber Cursino**, pela contribuição na seleção de pacientes.*

*À **Suely Chaves e Fernanda** da ASTEC, pela dedicação à estruturação e revisão deste trabalho, realizada de forma carinhosa e cristalina.*

*À “nossa” **Margareth**, pela disponibilidade, simpatia e competência com que conduz a secretaria da Pós Graduação do Departamento de Tocoginecologia FCM-UNICAMP.*

*A todas as **gestantes** que participaram voluntariamente deste estudo, sem as quais nada disto teria sido possível.*

*E finalmente, aos meus Professores Doutores **Henrique Vitor Leite, Antônio Carlos Vieira Cabral e Regina Amélia Lopes Pessoa Aguiar**, por despertarem em mim a paixão visceral pela Obstetrícia, Medicina Fetal e Genética Perinatal, minha eterna gratidão e admiração.*

*“... Não temas,
segue adiante, e não olhes para trás.
Segura na mão de Deus e vai ...”*

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas.....	ix
Resumo.....	xi
Summary.....	xiii
1. Introdução.....	15
1.1. Doença Hemolítica Perinatal	15
1.2. Bases Moleculares do Sistema de Grupos Sanguíneos Rh.....	23
1.3. Genotipagem RHD.....	27
2. Objetivos.....	38
2.1. Objetivo geral.....	38
2.2. Objetivos específicos	38
3. Publicação	39
4. Conclusões	63
5. Referências Bibliográficas	64
6. Bibliografia de Normatizações	79
7. Anexos	80
7.1. Anexo 1 – Ficha Clínica	80
7.2. Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	82
7.3. Anexo 3 – Sequência de primers utilizados na genotipagem RHD.....	83
7.4. Anexo 4 - Tamanho Amostral	84

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

AS-PCR	Técnica de PCR alelo-específica
CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Oligonucleotídeos livres (A,T,C,G) utilizados na reação da PCR
EDTA	Solução balanceada com tripsina sem íons, Cálcio e Magnésio, e com um agente quelante
EXON	Região do gene que codifica aminoácidos
g	Giros
INTRON	Região do gene que não codifica aminoácidos
Kb	Kilobase
Kda	Kilodalton
MgCl₂	Cloreto de magnésio
μl	Microlitro
ml	Mililitro
ng	Nanogramas
nmol	Nanomol
nt	nucleotídeo
pb	Pares de base

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pmol	Picomol
Primers	Sequência de oligonucleotídeos sintéticos
Rh	Sistema Rh
RhD	Antígeno RhD
<i>RH</i>	Genes <i>RH</i>
<i>RHD</i>	Gene que codifica o antígeno RhD
<i>RHCE</i>	Gene que codifica os antígenos RhC, Rhc, RhE, Rhe
<i>RHD</i>_ψ	Pseudogene <i>RHD</i>
RhD-positivo	Fenótipo Rh-positivo
RhD-negativo	Fenótipo Rh-negativo
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
V	Volts

Resumo

Introdução: A Doença Hemolítica Perinatal ainda contribui para as taxas de morbi-mortalidade perinatal, a despeito do amplo uso da imunoprofilaxia. A determinação da tipagem sanguínea RhD fetal é útil para o acompanhamento pré-natal das gestantes RhD-negativo sensibilizadas e para a profilaxia da Doença Hemolítica Perinatal, evitando-se desnecessários procedimentos invasivos, investigações sorológicas e administração da imunoglobulina humana nos casos de fetos RhD-negativo. A análise molecular do plasma materno abriu novas possibilidades para o diagnóstico pré-natal não invasivo, onde a genotipagem *RHD* fetal é uma das aplicações clínicas mais relevantes até o momento.

Objetivo: Avaliar o desempenho da genotipagem *RHD* fetal através da análise do plasma materno como método diagnóstico pré-natal não invasivo. **Método:** Foi conduzido um estudo de validação de teste diagnóstico a partir de 81 amostras sangüneas obtidas de gestantes RhD-negativo, entre 4 e 41 semanas de gestação. O DNA fetal foi extraído dos respectivos plasmas maternos utilizando kits comercialmente disponíveis. As regiões exon 10 e intron 4 do gene *RHD* foram testadas através da reação em cadeia da polimerase alelo-

específica (AS-PCR) convencional. Os resultados da genotipagem fetal foram comparados com a tipagem sanguínea neonatal e os dados analisados pelo *software* SAS – versão 8.2© (1999-2001). **Resultados:** 15 amostras foram obtidas no primeiro trimestre, 37 no segundo trimestre e 29 no terceiro trimestre. Houve falha de amplificação em 6 amostras, 3 RhD-negativo e 3 RhD-positivo à tipagem neonatal. A concordância entre os resultados da genotipagem e da tipagem neonatal foi de 97,3%, sensibilidade de 98,3% e especificidade de 93,8%. Foi observado 1 falso positivo no terceiro trimestre e 1 falso negativo no primeiro trimestre. **Conclusão:** AS-PCR convencional é um método com bom desempenho para a genotipagem *RHD* fetal através da análise do plasma materno, como método diagnóstico pré-natal não invasivo.

Summary

Introduction: Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn still contributes to perinatal morbidity and mortality, in spite of the widespread immunoprophylaxis. Prenatal identification of fetal *RHD* status is a goal of obstetrical practice, in order to prevent maternal immunization and to help in the management of alloimmunized pregnant women. The analysis of the maternal plasma opened up new possibilities for noninvasive prenatal diagnosis and the determination of fetal *RHD* genotype is one of the most relevant application of this molecular analysis.

Objective: To establish the performance of conventional PCR analysis of the maternal plasma as a method to genotype fetal *RHD*. **Method:** A validity of diagnostic test was conducted with 81 peripheral blood samples obtained from RhD-negative pregnant women, between 4 and 41 weeks of gestation. Commercially available kits were used to extract DNA from the maternal plasma. Exon 10 and intron 4 *RHD* gene regions were tested using conventional Allele-Specific Polymerase Chain Reaction (AS-PCR). Fetal *RHD* genotyping by PCR on maternal plasma was compared to conventional Rh typing in neonatal period and data analysed by SAS- 8.2 version© (1999-2001). **Results:** Samples were

obtained as follows: 15 on 1st, 37 on 2nd and 29 on 3rd trimester. Amplification failed in six of the specimens, 3 were RhD-negative and 3 RhD-positive at neonatal typing. Concordance between the genotyping and neonatal typing was 97.3%, sensitivity of 98.3% and specificity of 93.8%. One false positive in the third trimester and one false negative in the first trimester were observed.

Conclusion: Conventional AS-PCR is an accurate method for fetal *RHD* genotyping on maternal plasma, as a noninvasive prenatal diagnosis.

1. Introdução

1.1. Doença Hemolítica Perinatal

A passagem transplacentária de imunoglobulina da classe IgG da mãe para o feto é um fenômeno fisiológico durante a gravidez, e confere imunidade passiva durante os primeiros meses de vida da criança. Entretanto, a passagem de anticorpos contra as células sangüíneas do feto pode causar destruição (hemólise) prematura dessas células, levando a anemia fetal. Esta condição é chamada de Doença Hemolítica Perinatal (DHPN). Das formas clínicas de hemólise mediada por anticorpos IgG, a DHPN é a mais complexa porque envolve a produção de anticorpos em um indivíduo e destruição celular em outro.

A primeira descrição de que se tem registro da DHPN é de 1609, quando uma mulher francesa deu à luz um gemelar hidrópico natimorto e outro gemelar com icterícia grave. Durante alguns séculos este quadro clínico foi reconhecido como duas condições separadas, até que, em 1932, esta associação foi novamente descrita. DIAMOND et al. (1932) demonstraram que a anemia congênita, hidropisia fetal e icterícia faziam parte de uma mesma doença, na qual a hemólise fetal

estimulava a eritropoiese, levando à eritroblastenemia. Esta doença, a partir de então, devido à presença de hematopoiese extracelular e eritroblastenemia, ficou conhecida por muito tempo como Eritroblastose Fetal. A descoberta da causa da hemólise teve que esperar a descoberta do sistema de grupo sanguíneo Rh em 1939.

O principal antígeno eritrocitário responsável pela DHPN é o antígeno D do sistema Rh, devido a sua alta prevalência (85% da população branca) e alta imunogenicidade (AGRE e CARTRON, 1991; HOWARD et al., 1998; URBANIAK e GREISS, 2000). Por esta razão, embora existam 48 antígenos Rh, o antígeno D é o mais relevante clinicamente, sendo o indivíduo classificado como “Rh-positivo” ou “Rh-negativo” de acordo com a presença ou ausência do antígeno RhD, sem levar em consideração os demais antígenos. O antígeno RhD contribui com cerca de 60% dos casos de DHPN em fetos assintomáticos e 90% dos casos de anemia fetal grave (LAMBIN et al., 2002). O anticorpo anti-D foi encontrado em 58% das gestantes aloimunizadas (68/117) em uma maternidade brasileira, correspondendo a 67% do total de anticorpos contra antígenos do sistema Rh (68/102) (CIANCIARULLO et al., 2003), confirmando a alta prevalência do antígeno RhD também na nossa população. No ambulatório de Medicina Fetal do pré-natal especializado do CAISM- UNICAMP, o anticorpo anti-D foi encontrado em 93 das 95 gestantes aloimunizadas atendidas até 1999 (dados não publicados).

A sensibilização ao antígeno D ocorre quando uma gestante RhD-negativo é exposta a sangue RhD-positivo, deflagrando uma resposta imune materna contra o antígeno D. Basicamente, a sensibilização acontece no parto e puerpério, podendo também acontecer durante a gravidez, abortamento, gravidez ectópica

e transfusões incompatíveis. Como a circulação fetal está bem estabelecida com quatro semanas de gestação e o antígeno RhD foi demonstrado em células fetais já na sexta semana (30-40 dias) após a concepção (URBANIAK e GREISS, 2000), a sensibilização RhD pode se instalar, teoricamente, desde o início da gestação. Os anticorpos anti-D pertencem à classe IgG, portanto são capazes de atravessar a barreira placentária e destruir hemácias RhD-positivo fetais. Esta passagem de anticorpos é um processo ativo que envolve um fragmento da fração Fc do anticorpo anti-D e o receptor Fc na placenta. A imunoglobulina humana anti-D consiste principalmente das subclasses IgG1 e IgG3, que se diferenciam na estrutura bioquímica e nas propriedades biológicas. A subclasse IgG1 parece ser mais importante que a IgG3 na patogênese da anemia fetal (LAMBIN et al., 2002).

Cerca de 90% dos indivíduos RhD-negativo transfundidos com uma unidade de sangue RhD-positivo irão produzir anticorpos anti-D, enquanto que a taxa de sensibilização de uma gestante RhD-negativo é de aproximadamente 17% (CONTRERAS, 1998). Esta diferença se explica pelo fato de que o feto pode ser RhD-negativo no caso de heterozigotidade paterna e porque a quantidade de células sangüíneas fetais que atravessam a placenta é bem menor que aquela de uma transfusão incompatível.

A DHPN é caracterizada por anemia fetal de diferentes graus, hidropisia e óbito fetal. O quadro clínico varia desde uma discreta palidez até grave edema generalizado, com derrames pleurais e pericárdicos que prejudicam a função respiratória do neonato. Pensava-se que a hidropisia fetal era secundária somente à insuficiência cardíaca como resultado de anemia fetal grave e hipervolemia. A

hipótese mais recente é de que a ascite fetal seja decorrente da hipertensão venosa portal e umbilical. O crescimento extenso de áreas de eritropoiese ectópica no fígado resulta em compressão da circulação hepática e degeneração e distorção do parênquima hepático. Além disso, como resultado da disfunção hepática, desenvolve-se hipoproteinemia fetal, que juntamente com a placenta edematosa que tem dificuldade de transferir precursores das proteínas, também contribui para a ascite e o edema generalizado. Fetos do sexo masculino parecem ser mais gravemente afetados, quando comparados com os do sexo feminino (ULM et al., 1999).

Os fetos acometidos podem apresentar seqüelas no desenvolvimento neuropsicomotor secundárias ao dano cerebral. Mais recentemente, a incompatibilidade materno-fetal no sistema Rh tem sido relacionada a um aumento no risco de esquizofrenia para o indivíduo em formação (CANNON et al., 2002). A hipóxia crônica e o acúmulo de bilirrubina indireta, que é uma neurotoxina, poderiam danificar as células da glia e causar esquizofrenia.

Após a introdução e o amplo uso da imunoprofilaxia anti-D, e da diminuição do tamanho das famílias (ADAMS et al., 1981), houve um evidente decréscimo na incidência da DHPN (URBANIAK, 1998). A utilização da imunoprofilaxia pré-natal na 28^a semana de gestação e no período pós-natal tem reduzido a aloimunização em até 96% das mulheres de risco nos países desenvolvidos (TROLLE, 1989). Após este rápido e significativo decréscimo, as taxas de incidência têm se mantido constantes nos últimos anos devido a vários fatores: falha da administração da imunoprofilaxia (ausente, insuficiente ou inoportuna), falha no reconhecimento das

situações clínicas de hemorragia materno-fetal, transfusão sangüínea incompatível e sensibilização espontânea. Outra consequência do amplo uso da imunoprofilaxia anti-D foi um crescimento relativo da freqüência de aloimunização por outros antígenos (WENK et al., 1985). Contudo, o antígeno RhD continua sendo o antígeno mais freqüente. A incidência atual da DHPN nos países desenvolvidos é de aproximadamente 1 a 6/1000 nascidos vivos (MOISE JUNIOR, 2002).

A presença do anticorpo anti-D na circulação materna deve ser verificada na primeira consulta do acompanhamento pré-natal, e repetida pelo menos mais uma vez antes do parto, preferencialmente ao final do segundo trimestre. Se a gestante se mantiver sem o anticorpo anti-D, é desejável que ela receba uma dose da imunoglobulina humana anti-D na 28ª semana de gestação (ACOG, 1999). A imunoglobulina anti-D pode ter alguns raros efeitos adversos. Alguns fetos podem apresentar positividade fraca no teste da antiglobulina humana (Coombs) direto, sem, entretanto, desenvolverem a DHPN (BOWMAN et al., 1978). Apesar dos únicos casos descritos de transmissão de doenças infecciosas relacionada à administração da IgG anti-D datarem da década de 70, este risco não pode ser considerado zero, já que se trata de um derivado sangüíneo (MOISE JUNIOR, 2002). Uma vez sensibilizada (teste da antiglobulina serviço de referência em medicina fetal, sendo acompanhada com titulações humana indireto positivo), esta gestante é encaminhada a um seriadas do anticorpo e amniocenteses seriadas, na maioria dos casos.

Nenhum método isolado foi altamente indicativo de prognóstico perinatal das gestações complicadas por DHPN. A ultra-sonografia tem como primeira

evidência de feto acometido o aumento da circunferência abdominal devido à hepatoesplenomegalia. Outros achados são derrames cavitários e edema placentário. Infelizmente, embora facilmente diagnosticados, estes sinais ultra-sonográficos são tardios. Estudos recentes têm mostrado uma alta performance da medida do pico de velocidade sistólica na artéria cerebral média fetal por dopplervelocimetria, na predição da hemoglobinemia fetal (MARI, 2000), principalmente para casos de maior gravidade (MAGALHÃES, 2004). Apesar dos resultados promissores do seguimento das gestantes aloimunizadas com esta avaliação dopplervelocimétrica, a maioria dos serviços especializados ainda utiliza a análise espectral do líquido amniótico como indicador indireto da hemólise fetal.

A determinação direta do hematócrito e hemoglobina fetal através da cordocentese é o padrão mais fidedigno para determinação de prognóstico perinatal, além de permitir o tratamento imediato. A cordocentese permite também a determinação do fenótipo RhD fetal. Porém, as taxas de perda fetal relacionadas à cordocentese têm sido estimadas em 1% a 2% para os fetos não hidróticos e aproximadamente 15% para os hidróticos antes da vigésima semana gestacional e 5% após este período (URBANIÁK e GREISS, 2000). Além disso, a punção funicular pode causar hemorragia materno-fetal e agravar a sensibilização (SIKOVANYECZ et al., 2001).

Sem tratamento, 25% a 30% dos fetos terão algum grau de anemia hemolítica e hiperbilirrubinemia, e outros 20% a 25% desenvolverão hidropisia grave (TANNIRANDORN e RODECK, 1990). A transfusão intra-uterina (TIU) é o único tratamento específico para a DHPN disponível atualmente. A primeira

TIU foi realizada por fetoscopia no início da década de 80, mas foi rapidamente substituída pela TIU guiada por ultra-sonografia (BOWMAN, 1990). Dos fetos acometidos, 50% vão necessitar de TIU (BOWMAN, 1991). A taxa de mortalidade após TIU em centros de referência é de 14% a 38% para fetos hidróticos e ao redor de 10% se não hidróticos (POISSONNIER et al., 1989; SCHUMACHER e MOISE JUNIOR, 1996). Uma mortalidade perinatal de 16,3% para os fetos não hidróticos e 58,3% para os hidróticos, em 61 fetos submetidos a TIU, foi descrita no nosso meio (CABRAL et al., 2001).

Embora tenha sua etiologia, fisiopatologia, história natural e profilaxia bem estabelecidos, a Doença Hemolítica Perinatal ainda contribui de maneira significativa para a morbi-mortalidade perinatal, mesmo em países desenvolvidos. Sua abordagem terapêutica ainda é predominantemente invasiva, com riscos inerentes de perda fetal e aumento do grau de sensibilização.

Atualmente, o maior problema do seguimento das gestantes RhD-negativo sensibilizadas não recai sobre a decisão de transfundir ou não o feto, mas sim, sobre como se evitar a abordagem invasiva. Isto porque, todos os fetos são considerados “de risco” e recebem a mesma abordagem. Se considerarmos que aproximadamente 55% da população RhD-positivo é heterozigota para o gene *RHD* (LO, 1999), o feto de uma gestante RhD-negativo cujo pai é heterozigoto, tem 50% de chance de ser RhD-negativo, e portanto, não é “de risco” para desenvolver a DHPN e não necessitaria da mesma abordagem invasiva que um feto RhD-positivo.

Na ausência de evidências de sensibilização materna, e sendo o feto RhD-negativo, poderia ser evitada a exposição desnecessária à imunoglobulina humana anti-D na 28ª semana de gestação e após situações de possível sensibilização pré-natal decorrente de procedimentos invasivos e sangramentos. Como mencionado antes, este produto não é livre de riscos, além de ter custo ainda elevado para países como o Brasil.

Se a gestante RhD-negativo for previamente sensibilizada e o feto for RhD-negativo, quaisquer condutas especializadas subseqüentes seriam desnecessárias. Poderiam ser evitados futuros procedimentos invasivos, com seus riscos iatrogênicos e seu custo institucional (equipes, laboratórios, materiais especializados). Esta situação também diminuiria o fluxo de gestantes aloimunizadas para os centros de maior complexidade de atenção à saúde, referenciando-se apenas o grupo com fetos RhD-positivo.

A tipagem RhD fetal é, portanto, de primordial interesse para a medicina materno-fetal, pois permite a identificação de “fetos de risco” para a DHPN e também a identificação das “gestantes de risco” que podem se aloimunizar para o antígeno RhD, direcionando para estes grupos a intensificação dos cuidados pré-natais, atualmente empregados a todas as gestantes RhD-negativo. A caracterização do sistema Rh ao nível molecular tem permitido a identificação deste grupo de risco.

1.2. Bases Moleculares do Sistema de Grupos Sanguíneos Rh

Dentre os 29 sistemas de grupos sanguíneos reconhecidos pela International Society of Blood Transfusion (ISBT), o Sistema Rh (ISBT-004), descoberto em 1939, é o maior e o mais complexo, com o maior grau de polimorfismo entre os marcadores da membrana eritrocitária (HUANG, 1997).

¹Levine e Stetson, em 1939, descreveram a presença de um anticorpo na circulação de uma puérpera logo após transfusão de sangue doado por seu marido, que causava hemólise de 80% dos doadores "O". No ano seguinte, ²Landsteiner e Wiener verificaram que a injeção de sangue do macaco rhesus *Macaca mulatta* em coelhos e cobaias resultava na formação de anti-soro para hemácias de macaco rhesus. Quando este anti-soro era adicionado a amostras de sangue de outros macacos rhesus, ocorria aglutinação de hemácias. Este anti-soro aglutinava as células de 85% dos caucasianos de Nova York. Estes indivíduos foram posteriormente classificados como Rh ("Rhesus")-positivo. Os 15% restante, cujas células não aglutinaram, foram classificados como Rh-negativo. Em 1941, entretanto, ³Fisk e Ford observaram que o anticorpo descrito por Levine e Stetson não se tratava do mesmo anticorpo descrito por Landsteiner e Wiener, sendo confirmado

¹ LEVINE E STETSON, 1939 apud RACE, R.R. Modern concepts of the blood group systems. *Ann NY Acad Sci*, 127:884-91, 1965.

² LANDSTEINER e WIENER, 1940 apud RACE, R.R. Modern concepts of the blood group systems. *Ann NY Acad Sci*, 127:884-91, 1965

³ FISK e FORD, 1941 apud RACE, R.R. Modern concepts of the blood group systems. *Ann NY Acad Sci*, 127:884-91, 1965

posteriormente. Porém, o nome “Rh” de Rhesus não foi mudado por estar presente na maioria dos trabalhos originados na época (RACE, 1965).

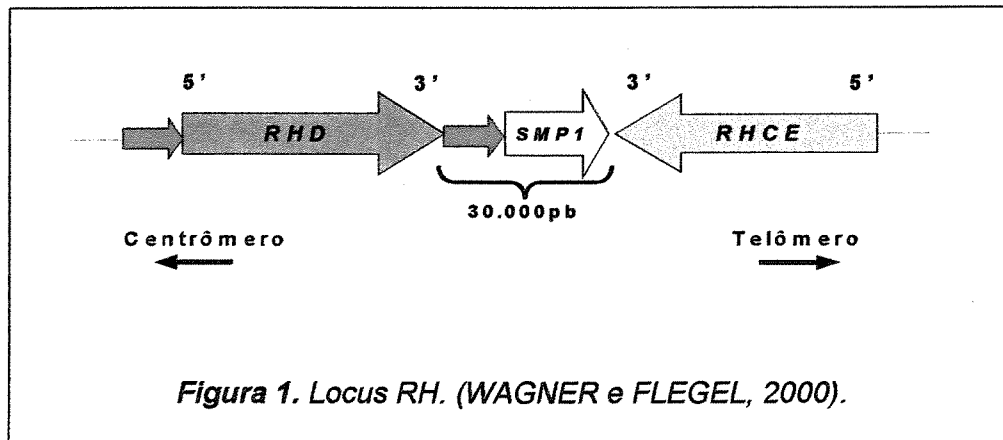
O sistema Rh compreende, atualmente, 48 antígenos de membrana eritrocitária (DANIELS et al., 2003). Os cinco principais antígenos são: D, C/c e E/e, que formam oito complexos gênicos, conhecidos como haplótipos Rh (Cde, cde, cDE, cDe, cdE, Cde, CDE, CdE). Diferentemente dos antígenos ABO e Lewis, os antígenos Rh estão localizados somente nos eritrócitos e, portanto, não são encontrados nos fluidos. MOORE et al. (1982) e GAHMBERG (1982), trabalhando independentemente, descreveram as proteínas Rh, após isolamento por imunoprecipitação, e permitiram que os estudos avançassem no sentido de caracterização bioquímica e funcional destas proteínas membranares.

Os antígenos do sistema Rh estão associados a proteínas não glicosiladas e hidrofóbicas da membrana eritrocitária de peso molecular de 30-32 Kda (polipeptídeos Rh) e a glicoproteínas de 40 a 100 Kda chamadas glicoproteínas associadas ao Rh (RhAG). As proteínas Rh são cadeias polipeptídicas de 417 aminoácidos que atravessam a membrana eritrocitária 12 vezes, apresentando os segmentos amino-terminal e carboxi-terminal na face intracelular da membrana (CARTRON, 1999). As principais diferenças entre as proteínas RhD e RhCE estão na substituição de 32-36 aminoácidos, resultando em uma divergência de 8,4% na sequência polipeptídica (LE VAN KIM et al., 1992). A exata função biológica destas proteínas ainda não é totalmente conhecida. Estas proteínas estão “embebidas” na camada lipídica da membrana eritrocitária formando, junto com outras proteínas codificadas por genes independentes, o chamado

“complexo Rh” e parecem exercer fundamental papel estrutural, já que indivíduos com ausência de antígenos Rh (fenótipo Rh_{null}) apresentam vários defeitos membranares (CARTRON, 1999).

Os polipeptídeos Rh são codificados por dois genes distintos, cada um contendo 10 exons, em uma sequência genômica de aproximadamente 75 kb. O gene *RHD* codifica o antígeno D e o gene *RHCE* codifica os antígenos C/c e E/e (alelos RhCe, RhcE, Rhce e RhCE) (CHÉRIF-ZAHAR et al., 1991). Existe um alto grau de homologia (98%) entre os genes *RHD* e *RHCE*, cujas diferenças básicas estão na região do exon 10 e na deleção de 600 pb no intron 4 do gene *RHD*, se comparado ao gene *RHCE*. Estas diferenças nas sequências são utilizadas nas técnicas de genotipagem.

Os dois genes *RH*, presentes em *loci* diferentes do braço do cromossomo 1 (1p34–36), possuem orientações opostas e estão separados por aproximadamente 30.000 pb (FLEGEL e WAGNER, 2000). Nesta região intergênica encontra-se um gene denominado *SMP1*, que tem a mesma orientação do gene *RHD* e cuja função no *locus* ainda é desconhecida. O gene *RHD* está flanqueado por dois segmentos de DNA denominados “caixas Rhesus”, com comprimento de 9000 pb, com mesma orientação (Figura 1).



Esta proximidade e posicionamento entre os genes *RHD* e *RHCE* facilitam a ocorrência de conversão gênica em cis durante os rearranjos gênicos, levando à formação de genes híbridos responsáveis por algumas variantes do antígeno RhD que contribuem para a diversidade fenotípica Rh.

Foi demonstrado, através da análise do DNA genômico de diferentes fenótipos do sistema Rh, que indivíduos RhD-positivo possuem os genes *RHD* e *RHCE*, e os indivíduos RhD-negativo possuem somente o gene *RHCE* (COLIN et al., 1991). Na maioria dos indivíduos caucasianos RhD-negativo, o gene *RHD* encontra-se deletado. No entanto, outros mecanismos moleculares têm sido descritos associados à não expressão do gene *RHD*, principalmente em populações não caucasianas (DANIELS et al., 1997; OKUDA et al., 1997; SINGLETON et al., 2000; RODRIGUES, 2002).

Todas estas descobertas possibilitaram a padronização de técnicas moleculares para a determinação do genótipo RH com finalidades propedêuticas na medicina interna, transfusional, forense e perinatal.

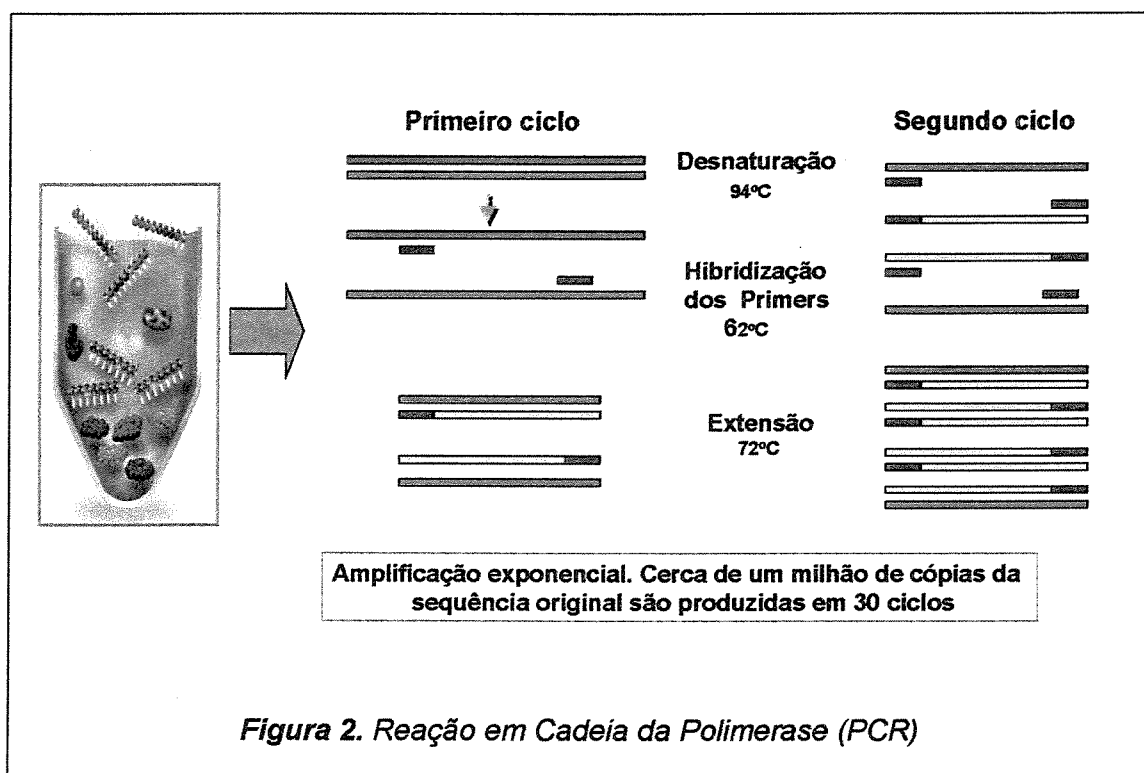
1.3. Genotipagem RHD

Antes da clonagem do gene *RHD* (LE VAN KIM et al., 1992), a determinação pré-natal da tipagem RhD fetal era realizada através de amostras de sangue fetal, método invasivo associado a risco de 1% a 2% de perda fetal (NICOLINI et al., 1988; WEINER e OKAMURA, 1996) e 40% de hemorragia materno-fetal (NICOLINI et al., 1988; WEINER e OKAMURA, 1996; CHITRIT et al., 1998; SIKOVANYECZ et al., 2001).

Após a elucidação das bases moleculares do sistema Rh durante a última década, um grande número de métodos de genotipagem foram desenvolvidos para sua determinação (AVENT et al., 2000). Os métodos atuais de genotipagem *RHD* são baseados na técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR-Polymerase Chain Reaction) por amplificação de sequências específicas dos genes *RH*. A presença de genes híbridos, pseudogene *RHD* (*RHD Ψ*) e o grande número de variantes Rh podem dificultar a interpretação dos resultados da genotipagem *RHD*. Assim, a análise de duas ou mais regiões do gene *RHD* torna-se necessária para se obter um resultado mais seguro. Um protocolo único, totalmente sem resultados falsos ou discordantes com a fenotipagem, ainda não se encontra disponível (YANKOWITZ et al., 1995; AUBIN et al., 1997; GASSNER et al., 1997; MAASKANT-VAN WIJK et al., 1998; KROLL et al., 2001).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) para a genotipagem pode ser realizada sempre que a sequência de um gene for conhecida e que as mutações responsáveis por um fenótipo de grupo sanguíneo tenham sido determinadas. Uma

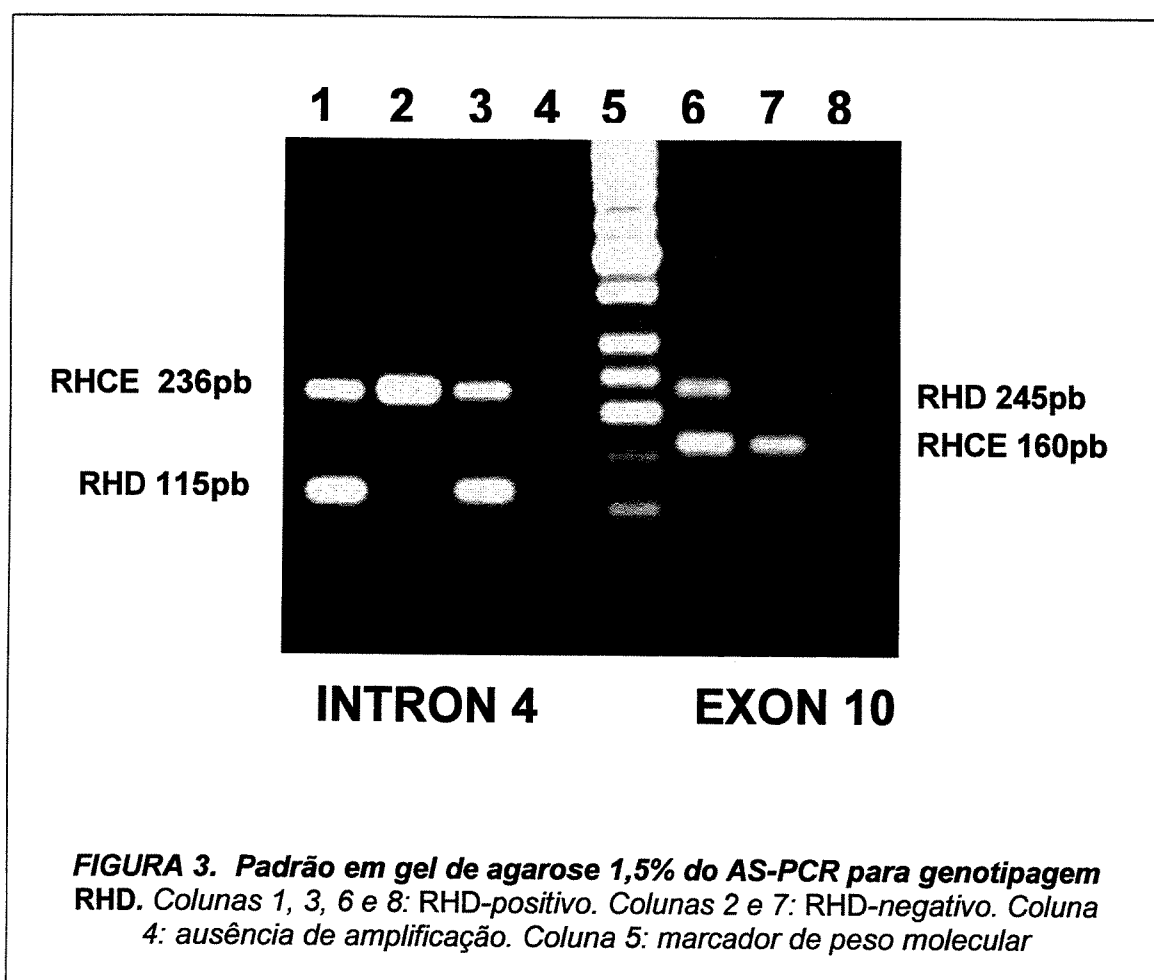
seqüência específica de oligonucleotídeos (*primer*) se liga ao DNA-alvo, quando este está presente, e produz novas fitas a partir da fita-molde e dos oligonucleotídeos livres (dNTPs) adicionados à reação (Figura 2). Devido à quantidade inicial de DNA necessária ser pequena em relação aos outros métodos de diagnóstico molecular, a PCR é particularmente útil no diagnóstico pré-natal.



A PCR tem outras vantagens tais como simplicidade técnica, rapidez de execução (24-48 horas), especificidade de amplificação e custo relativamente baixo. Suas maiores limitações estão no potencial de contaminação, amplificações

inespecíficas e falha de amplificação. Além disto, não é capaz de identificar mutações de ponto, apenas deleções e inserções. O sucesso da amplificação depende da quantidade e da qualidade do DNA extraído.

A genotipagem *RHD* fetal através da reação em cadeia da polimerase baseia-se na comparação dos diferentes tamanhos dos produtos de amplificação relacionados aos genes *RHD* e *RHCE* em diferentes regiões gênicas (Figura 3).



A interpretação do método apoia-se no fato de que a mãe *RHD*-negativo não possui o gene *RHD*. Quando o estudo molecular pela PCR amplifica parte do gene *RHD* no plasma desta mãe, este gene deve ser *non-self* e, portanto, infere-se ser de origem fetal. A determinação RhD fetal ao nível molecular pode ser feita com tecidos fetais como amniócitos, células trofoblásticas e células sanguíneas.

As tentativas de utilização de amostras de vilo corial para genotipagem *RHD* precocemente na gravidez pela técnica do PCR mostraram bons resultados, com altas taxas de concordância com a tipagem convencional (maiores que 96%). No entanto, a biópsia de vilo corial não foi amplamente adotada pela prática clínica com esta finalidade devido aos riscos de perda fetal e de hemorragia materno-fetal (BLAKEMORE et al., 1986; GHIDINI et al., 1993).

A genotipagem *RHD* fetal em líquido amniótico tem sido considerada um método confiável (Tabela 1). Do total de 498 genotipagens pela análise do líquido amniótico em uma revisão de nove trabalhos, foram encontrados cinco (3,9%) falsos negativos e três (0,6%) falhas na amplificação (VAN DEN VEYVER e MOISE JUNIOR, 1996). Em outra revisão, incluindo 12 trabalhos e 963 amostras de líquido amniótico, a sensibilidade foi de 99,5% e especificidade de 98,8% (CHROMBACH et al., 1999). Apesar da confiabilidade destes resultados, de apresentar riscos fetais menores se comparada à obtenção de vilo corial ou sangue fetal, e da rapidez para se obter os resultados, a amniocentese não é isenta de riscos, o que motivou os pesquisadores a continuarem a busca por métodos diagnósticos não invasivos.

TABELA 1
Genotipagem RHD fetal em líquido amniótico e vilo corial – Principais Estudos

Referência	n	Taxa de Concordância* (%)
BENNETT et al., 1993	15	100
LIGHTEN et al., 1995	135	98,5
VAN DEN VEYVER et al., 1996	114	100
CROMBACH et al., 1997	59	100
PERTL et al., 2000	50	100
Chan et al., 2001	64	100
Cotorruelo et al., 2002	65	100

O trânsito de células entre os compartimentos materno e fetal foi descrito pela primeira vez em 1893 (⁴SCHMORL), mas somente foi reconhecido como um fato de importância clínica recentemente. Baseados nas evidências deste trânsito de células nucleadas (LO et al., 1996), e na possibilidade de isolamento das células fetais a partir do compartimento materno (HERZENBERG et al., 1979; LEWIS et al., 1996, GUSSIN e ELIAS, 2002), vários grupos estudaram a possibilidade da realização da tipagem *RHD* fetal através do uso de células fetais extraídas da circulação materna (LO et al., 1993; GEIFMAN-HOLTZMAN et al., 1996; SEKIZAWA et al., 1996). Entretanto, o isolamento das células fetais mostrou-se tecnicamente sofisticado e demorado, limitando seu uso. Além disso, demonstrou-se que as células fetais permanecem na circulação (BIANCHI et al., 1996) e na

⁴ SCHMORL, G., 1893 apud PERTL, B.; BIANCHI, D.W. Fetal DNA in maternal plasma: emerging clinical applications. *Obstet Gynecol*, 98:483-90, 2001.

pele materna (ARTLETT et al., 1998) por muitos anos após o parto, o que possibilitaria resultados falsamente positivos.

Estimulado pela descrição da presença de DNA de origem tumoral no plasma de pacientes com câncer (CHEN et al., 1996), o grupo de pesquisadores liderados por LO et al. (1997) encontrou DNA fetal no soro e plasma materno, através da identificação de seqüência específica do cromossomo Y (SRY) em mães com fetos masculinos. Esta notável descoberta abriu novas possibilidades de diagnóstico molecular pré-natal sem os riscos inerentes aos procedimentos invasivos. Como abordagem alternativa, alguns pesquisadores exploraram a detecção de cópias de RNA mensageiro do gene *RHD* obtidas do plasma materno, porém o pequeno número de casos descritos não permitiu a validação deste método (HAMLINGTON et al., 1997; AL-MUFTI et al., 1998).

O exato mecanismo de liberação do DNA fetal livre na circulação materna ainda não está totalmente elucidado. As evidências sugerem que parte deste DNA é derivado de elementos celulares sangüíneos, embora a maior parte seja de origem placentária (BIANCHI, 1998; BIANCHI, et al., 2001). Como o DNA plasmático tem sido considerado um marcador de morte celular (FOURNIE et al., 1993), postula-se que o DNA fetal é liberado a partir de células mortas, por apoptose (VAN WIJK et al., 2000), necrose ou destruição imunológica. A hemólise de células fetais provocada pelo anticorpo materno anti-D, entretanto, não parece ser a principal fonte do DNA fetal (FINNING et al., 2002).

O DNA plasmático é formado principalmente por fragmentos pequenos. O tamanho destes fragmentos parece ser maior nas gestantes, quando comparado com mulheres não grávidas. Observou-se também que as moléculas de DNA livre no plasma materno de origem fetal são de dimensões menores do que aquelas do DNA de origem materna (CHAN et al., 2004).

Além da vantagem de ser um método não invasivo e, ao contrário das células fetais que podem permanecer na circulação materna por muitos anos (BIANCHI et al., 1996), o DNA fetal livre desaparece rapidamente do plasma materno após o término da gestação (FAAS et al., 1998; LO et al., 1998b; 1999; ARIGA et al., 2001; NELSON et al., 2001; BENACHI et al., 2003). As nucleases plasmáticas não parecem ser as únicas responsáveis pela remoção do DNA fetal (LO et al., 1999). O fígado e o rim têm sido apontados como responsáveis pela depuração do DNA fetal circulante (BOTEZATU et al., 2000; NELSON et al., 2001).

O protocolo inicial utilizado por LO et al. (1997), utilizou o PCR convencional e alcançou sensibilidade de 70% e 80% para análise do soro e plasma materno, respectivamente. Outros autores tentaram aumentar a sensibilidade da técnica utilizando nested PCR, onde os produtos de amplificação da primeira reação são re-amplificados em uma segunda reação (SMID et al., 1999). A subsequente utilização do real-time PCR permitiu, finalmente, que a sensibilidade na detecção do SRY alcançasse valores próximos a 100% (LO et al., 1998a).

O real-time PCR permitiu, além do aumento da sensibilidade, a análise quantitativa do DNA. A partir desta técnica, LO et al. (1998b) concluíram que o

DNA fetal (SRY) livre no plasma materno é encontrado em quantidades relativamente grandes, comparado com seu pequeno número em células fetais, e que sua concentração aumenta com o progredir da idade gestacional. Esta relação direta da concentração do DNA fetal com a idade gestacional foi posteriormente confirmada em outros estudos (ARIGA et al., 2001; SEKIZAWA et al., 2001; FINNING et al., 2002). A concentração do DNA fetal encontrada foi de 3,4% e 6,2% do DNA total do plasma materno durante as fases iniciais (primeiro trimestre e início do segundo trimestre) e finais da gestação (terceiro trimestre), respectivamente (LO et al., 1998b). Parece haver uma ampla variação nesta concentração para uma mesma gestante, dentro de um período de tempo (ARIGA, et al., 2001; HAHN et al., 2001)

A primeira aplicação clínica da análise do DNA fetal livre no plasma materno com sucesso tem sido a determinação da tipagem RhD fetal. Como mencionado previamente, o diagnóstico pré-natal do genótipo *RHD* fetal permite identificar as gestações realmente de risco para desenvolverem a Doença Hemolítica Perinatal. Vários grupos publicaram resultados promissores com o uso dessa fonte não invasiva de material fetal para a determinação do fenótipo RhD fetal (Tabela 2). Basicamente, podem ser divididos em dois grupos, de acordo com a técnica de PCR utilizada: convencional ou real-time. Os valores de sensibilidade, especificidade e valores preditivos são próximos de 100%, mas variam entre os principais estudos. Por utilizarem diferentes métodos, os resultados são de difícil comparação.

TABELA 2

Genotipagem *RHD* fetal em plasma materno: resultados dos principais estudos

Referência	n	IG	Região gênica	TC (%)	Sen. (%)	Esp. (%)	VPP (%)	VPN (%)
PCR convencional								
FAAS et al., 1998	31	12-34	E 7	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
BISCHOFF et al., 1999*♦	20 (C) 16(RT)	15-36	E 7	-	(C)50,0 (RT)62,0	-	-	-
ZHONG et al., 2000**	22	10-21	E 7	95,4	100,0	75,0	94,7	100,0
NELSON et al., 2001♦	26	9-34	E 10	-	100,0	-	-	-
JOHNSON et al., 2003	47	18-40	E 4, 5, 10	97,8	100,0	91,0	97,3	100,0
SIVA et al., 2003	28	15-17	E 7, 10	80,8	85,0	66,7	89,5	57,1
Real-time PCR								
LO et al., 1998a	57	7-41	E 10	96,5	94,9	100,0	100,0	90,0
ZHANG et al., 2000	58	#	E 7	98,3	96,9	100,0	100,0	96,3
ZHONG et al., 2001	34	13-17	E 10	97,0	96,3	100,0	100,0	87,
FINNING et al., 2002	137	8-42	E 10, 4, 5, 6	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
COSTA et al., 2002	102	8-14	E 10	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
LEGLER et al., 2002	36	11-38	E 7, <i>RHD</i> ψ	-	93,0	100,0	-	-
RANDEM et al., 2003	114	6-38	E 7	92,1	92,7	90,6	96,2	82,9
RIJNDERS et al., 2004	72	11-19	E 7	98,6	100,0	96,5	97,7	100,0

IG= idade gestacional; C= PCR convencional; RT= *real-time* PCR; TC=Taxa de concordância: número de verdadeiros positivos + verdadeiros negativos, dividido pelo número total de amostras; Sen= sensibilidade; Esp= especificidade; VPP= valor preditivo positivo; VPN= valor preditivo negativo; E= exon

Todos os trimestres, mas não citou as idades gestacionais

* Usaram *nested* PCR convencional em 20 amostras e *real-time* PCR em 16 amostras

** Usaram *nested* PCR convencional

♦ Estudaram apenas fetos RhD-positivo, calculado somente a sensibilidade

O *real-time* PCR, apesar das vantagens sobre o convencional, como a monitorização e quantificação dos produtos de amplificação, a maior sensibilidade e menor susceptibilidade à contaminação (HATTORI et al., 1992), trata-se de uma

técnica que exige laboratório e pessoal especializado, e não está disponível para uso rotineiro em nosso meio.

Para finalizar, é importante ressaltar que a distribuição fenotípica do sistema Rh varia entre os grupos étnicos. Uma determinada técnica de genotipagem pode não ser totalmente aplicável para uma determinada população, de origem étnica diferente ou diversificada. Portanto, seria interessante que os protocolos de genotipagem fossem individualizados para diferentes populações. A população brasileira tem uma característica que a faz única: alta miscigenação, com imigrantes oriundos das diversas partes do mundo, em um país com dimensões continentais. Começam a surgir estudos direcionados à padronização de técnicas moleculares para grupos sanguíneos no nosso meio, inicialmente para doadores de sangue (PELLEGRINO JUNIOR, et al., 2001) e para pacientes politransfundidos (CASTILHO et al., 2002). Ainda não existem, até o momento, estudos verificando a utilidade destes métodos para genotipagem pré-natal em nosso meio.

Considerando a utilidade clínica da tipagem sanguínea fetal de forma não invasiva na condução de gestantes RhD-negativo, um estudo de validação da genotipagem *RHD* fetal em nossa população, utilizando técnicas moleculares disponíveis na maioria dos laboratórios de biologia molecular, pode trazer benefícios imediatos e a longo prazo na condução destas gestações.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar o desempenho da genotipagem *RHD* fetal através da análise do plasma materno por PCR como método diagnóstico para identificação do tipo sanguíneo fetal em gestantes RhD-negativo.

2.2. Objetivos específicos

- Comparar os resultados da genotipagem *RHD* fetal obtidos pela análise do plasma materno com os resultados da tipagem sanguínea RhD na amostra de sangue periférico do recém-nascido no período neonatal.
- Estabelecer a sensibilidade, especificidade e valores preditivos da genotipagem *RHD* fetal através da análise do plasma materno, na população estudada.

3. Publicação

Title: Fetal *RHD* genotyping from maternal plasma in a population with a highly diverse background.

Short Title: Fetal *RHD* genotyping in a highly diverse population.

Authors: Isabela Nelly Machado¹, Lilian Castilho², Jordão Pellegrino Jr.², Ricardo Barini¹

1-Fetal Medicine Unit, Department of Gynecology and Obstetrics, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

2-Hemocentro Unicamp, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

Correspondence to: Isabela Nelly Machado. Rua Izabel Negrão Bertotti, 30, apto 504. Mansões Santo Antônio. CEP 13087-671, Campinas, Brazil.

Tel: (+55-19-3296 0482)

Email: imachado@fcm.unicamp.br

Sponsored by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), **grant number** 2002/08930-2

Abstract

Objectives: To establish the performance of conventional PCR as a noninvasive method for fetal genotyping by analysis of distinct *RHD* regions from maternal plasma in a population with mixed ethnic origin.

Methods: We conducted a validity of diagnostic test by analyzing 81 plasma samples from RhD-negative Brazilian pregnant women, from 4 to 41 gestational weeks. We tested for exon 10 and intron 4 gene regions by AS-PCR. Fetal *RHD* genotyping by PCR on maternal plasma was compared to conventional RhD typing in neonatal period .

Results: Samples were obtained as follows: 15 on 1st, 37 on 2nd and 29 on 3rd trimester. Amplification failed in six of the specimens, 3 were Rhesus-negative and 3 Rhesus-positive at neonatal typing. General accuracy was 97.3%, sensitivity of 98.3% and specificity of 93.8%. One false positive in the third trimester and one false negative in the first trimester were observed. Successful amplification of the *RHD* gene intron 4 region was observed in 87.1% of 62 Rhesus-positive newborns and in 14.5% for the exon 10 gene region.

Conclusion: Conventional PCR is an accurate method for fetal *RHD* genotyping on maternal plasma, even in a mixed ethnic origin population.

Key Words: Fetal DNA, PCR, *RHD* genotyping, maternal plasma, prenatal diagnosis.

Introduction:

Hemolytic Disease of the Fetus and the Newborn (HDFN) still contributes to perinatal morbidity and mortality, in spite of the widespread immunoprophylaxis (Hughes et al., 1994; Portmann et al., 1997; Moise Jr, 2002). While the perinatal mortality rate continues to fall, mainly through advances in obstetric and neonatal care, the rates of new cases of RhD immunization in RhD-negative pregnant women has remained relatively constant (Bowman and Pollack, 1987; Stangenberg et al., 1991). Currently, the main problem in the management of RhD-negative women is not once a decision for transfusion has been made, but instead it is how to avoid invasive investigations for as long as possible.

The Rh antigens are the main cause of HDFN. Because of its strong immunogenicity, RhD is the most important antigen of the polymorphic Rh system. In the fetus the RhD antigen is well developed by 30-40 days gestation, and HDFN can occur antenatally from as early as six weeks (Urbaniak and Greiss, 2000).

The Rh blood group system contains antigens produced from two distinct genes, *RHD* and *RHCE*, which are tandemly localized on the short arm of the chromosome 1 (Flegel and Wagner, 2000). They are greater than 95% homologous at the nucleotide sequence level, but there are a number of sequence differences between them which can be utilized in genotyping assays to identify the presence or absence of the *RHD* gene. Diverse mechanisms give rise to a wide variety of Rh phenotypes (Okuda and Kajii, 2002). For this reason, the Rh system is the most complex blood group system to define using DNA-based techniques. Different PCR assays amplify *RHD*-specific DNA

sequences at exon 10, exons 4 through 5, exon7 and intron 4, where are localized the most of the differences between the *RH* genes (Bennett et al., 1993; Simsek et al., 1994; Spence et al., 1995; Van den Veyver et al., 1996; Crombach et al., 1997). To establish reliable and workable solutions for *RH*-DNA typing is probably the most challenging task among all blood group genotyping applications (Flegel et al., 1998).

Prenatal determination of fetal *RHD* genotype would be useful in the management of pregnancies. If the fetus is predicted to be *RHD*-negative in an immunized mother, the need for further invasive techniques is diminished. Consequently, transplacental hemorrhage with deterioration of clinical features and procedure-related fetal losses are avoided. Despite this, no other investigations and unnecessary immune globulin anti-D administration are avoided in non-immunized pregnant women. When the father is heterozygous at the *RHD locus* (56% in white populations), the fetus has a 50% chance of being RhD-negative, and therefore unaffected.

Many polymerase chain reaction (PCR)-based tests to analyze fetal DNA have been reported. After the first report by Bennett et al. (1993), accurate analysis of fetal DNA extracted from amniocytes and chorionic villus were introduced (Lighten et al., 1995; Spence et al., 1995; Van den Veyver et al., 1996; Crombach et al., 1999; Pertl et al., 2000; Cotorruelo et al., 2002). Although the concordance rates mean higher than 99% (Crombach et al., 1999), both chorionic villus sampling and amniocenteses also do not avoid hazardous invasive procedures.

The recent identification of high concentrations of cell-free fetal DNA in maternal plasma (Lo et al., 1997; 1998b) made the noninvasive fetal *RHD* genotyping possible. The analysis of this cell-free DNA is advantageous as the fetal DNA has a very short post-partum half-life (Lo et al., 1999; Benachi et al., 2003). It has been demonstrated that real-time PCR assays can obtain accurate results in a quick and non-demanding way (Lo et al., 1998a; Zhang et al., 2000; Zhong et al., 2001; Costa et al., 2002; Finning et al., 2002; Legler et al., 2002; Randen et al., 2003; Rijnders et al., 2004). Unfortunately, the fluorescence-based real-time polymerase chain reaction is limited to a few specialized laboratories. Conventional PCR assays have been used for this purpose in recent studies (Faas et al., 1998; Nelson et al., 2001; Johnson et al., 2003; Siva et al., 2003).

The most of the primer sets developed for molecular fetal genotyping were based on sequences of individuals usually of Caucasian origin. There are now known to be several genetic causes for the RhD-negative phenotype of an individual, which incidence varies according to ethnic origin. The Brazilian population is of heterogeneous ethnical origin, with unevenly distributed population within a country of continental dimensions. The intense process of miscegenation made the Brazilian population unique in its ethnic background (Pellegrino Jr et al., 2001), and there's no clear distinction of races in Brazil.

For these reasons, we conducted a validity study to evaluate the clinical application of fetal *RHD* genotyping from maternal plasma using the conventional PCR, by assessing its performance, in a population with mixed ethnic origin.

Methods

Subjects and blood samples: Peripheral blood samples (5 – 10 ml) were obtained from 81 RhD-negative pregnant women, with singleton pregnancies, during a routine prenatal visit. The subject's population was from all regions of Campinas, city in the Southeastern Brazil. This population is of high mixed ethnic background, with admixture between descendants of Europeans, Africans and Native Americans.. Blood samples from sensitized women were collected before invasive procedures. All the women gave informed consent. Approval for the study was provided by the institution's ethical committee.

All samples were processed and analyzed at the laboratory of molecular biology of blood groups at the Hemocentro Unicamp (UNICAMP- Campinas- Brazil). The samples were numbered according to the time of collection.

Samples were collected into vacutainer blood tubes containing EDTA and centrifuged at 3000g for 20 minutes to separate the plasma. Plasma aliquots were stored at 4 °C until further processing. Before DNA extraction, each plasma sample was re-centrifuged at 3000g for 15 minutes and the upper phase was used for the DNA extraction.

All pregnant women were submitted to an ultrasound evaluation to confirm the gestational age.

DNA extraction: DNA was extracted from 500 µl of the plasma sample, using the Easy DNA Kit (Invitrogen®, Carlsbad, CA), according to the manufacturer's recommendation. Ten µl of the DNA were used for the PCR assay.

PCR analysis: A thermal cycler Perkin Elmer (model 9700, Foster City, CA) was used for the PCR. The primers and amplification conditions used for *RHD* genotyping have been previously published (Castilho et al., 2002). The PCR was formed with 50 pmol of each primer, 2nmol of each dNTP, 1,0 U of Taq DNA Polymerase (Invitrogen®, Carlsbad, CA) and buffer in a final volume of 50µl.

Negative internal water control was included to check possible contamination. To ensure quality control of the reagents, control reactions containing known RhD-positive and RhD-negative DNA were performed simultaneously with the test reaction.

Thermal cycling was carried out in 35 cycles after 15 minutes of denaturation at 95 °C. Each cycle consisted of : 94 °C for 20 seconds, 62 °C for 20 seconds, 72 °C for 20 seconds and 72 °C for 10 minutes. Five to 10 µl of each DNA product were size-separated by electrophoresis in 1–2 % agarose gel for 45-60 minutes at 100 V, visualized by ethidium bromide (0.5µl) staining and photographed under ultraviolet light to confirm amplification.

***RHD* genotyping:** The PCR products examined in the agarose gel were interpreted based on the differences between *RHD* and *RHCE* genes in two genomic regions: intron 4 and exon 10. For intron 4, a set of 3 primers (RHI41, RHI42, RHI43) yielded a product of 115 bp for *RHD* and 236 bp for *RHCE*. For exon 10, a common 5'

primer (EX10F) was used for both *RHD* and *RHCE*. When paired with the *RHD*-specific 3'- untranslated region primer (*RHD*3'-UTR), it yielded a product of 245 bp, and when paired with the *RHCE*-specific-3' – UTR primer (*RHCE*3'- UTR), it yielded a product of 160 bp.

The fetus was predicted to be RhD-positive when *RHD* exon 10 and/or intron 4 were amplified, and RhD-negative when no *RHD* signal (nor *RHD* intron 4 neither exon 10) was obtained and at least one region of the *RHCE* gene was amplified.

The RhD type of the fetus was unknown to the investigator performing the PCR at the time of analysis.

Anticontamination Measures: Separate areas to set up each step described above were used to prevent contamination of the PCR assays, in addition to the internal water control of the PCR reaction mixtures. All manipulations were carried out with disposable material and frequent changes of gloves.

Neonatal RhD phenotyping: Umbilical cord blood samples from neonates or fetuses were collected into EDTA tubes and the phenotyping were determined by hemmagglutination in gel cards (Diamed AG, Morat, Switzerland). Samples from neonates were collected during delivery.

Statistical analysis: The sensitivity, specificity, positive and negative predictive values were tested by comparing the PCR results with RhD serologic typing in neonatal blood. For all statistical procedures, the SAS – 8.2 version © (1999-2001) software was used.

Results

A total of 81 maternal plasma samples were analyzed by our PCR approach. The gestational ages at the time of blood sampling ranged from 4 to 41 weeks (mean: 24 weeks, median: 25 weeks). Fifteen samples were from the first trimester (18.5%), 37 from the second (45.7%), and 29 from the third trimester of gestation (35.8%). RhD type on newborn blood was obtained from all samples. Among the 81 fetuses, 62 were RhD-positive and 19 were RhD-negative.

Amplification of fetal DNA (*RHD/CE*) was successful in 75 of 81 fetuses (92,6%). In the six additional cases, despite repeated attempts, neither the *RHD* nor the *RHCE* gene were identified, and they were not considered in subsequent analysis. Smear bands (loss of strength and definition of the band) generated by the PCR amplification could not be interpreted securely, and they were also considered as unsatisfactory results. Three of these 6 non-interpretable results were RhD-positive on the post-delivery phenotyping, and they were from the second (1 case) and third trimester (2 cases). The additional 3 samples were from RhD-negative fetuses, 2 from the second trimester and 1 from the third one.

From the 75 samples that were amplified successfully, 59 were *RHD*-positive and 16 were *RHD*-negative. One RhD-positive fetus from the first trimester (12 weeks) was genotyped as *RHD*-negative (false negative), and one RhD-negative fetus from the third trimester (34 weeks) was genotyped as *RHD*-positive (false positive). Repeated

PCR analysis of these misgenotyped samples confirmed the false results. We were unable to resample the discordant individuals and to genotype the family.

The results of the *RHD*-PCR assay of maternal plasma samples are shown in TABLE 1. The overall sensitivity of determination of *RHD* fetus status from maternal plasma was 98.3% and the specificity was 93.8%. A concordance rate of 97.3% (73/75) was observed between polymerase chain reaction and serologic typing. The earliest positive result obtained was at 4 weeks of gestation.

Among the 62 *RHD*-positive fetuses, the *RHD* exon 10 was amplified in 14.5%, and the *RHCE* in 32.1% of the total aliquots. For the intron 4 primer, 87.1% of the *RHD* was amplified in the RhD-positive fetuses, and the *RHCE* in 46.9% of the total samples. The sensitivity, specificity, and predictive values of the two different *RHD* gene regions used to fetal genotyping in maternal plasma are listed in TABLE 2. Ascertainment of RhD type by PCR required that 61 samples (75.3%) be repeated at least twice.

Discussion

Maternal plasma analysis for determination of the fetal *RHD* status is an exciting new tool for the management of RhD-negative pregnant women, specially sensitized women. In this prospective study we have demonstrated that the conventional polymerase chain reaction analysis of the maternal plasma can be used for the fetal *RHD* genotyping, even in an ethnic mixed population.

Knowledge of the structure of the *RH* locus is far from complete, and variation in gene organization in different populations is emerging. The RH-PCR techniques are based on the dogma that, the D-negative phenotype results from the completely absence of the *RHD* gene. This rule, however, does not apply to non-Caucasian population, where the *RHD* gene may occasionally be present but dysfunctional (Singleton et al., 2000).

The selection of a specific DNA typing system may be guided by practical considerations specific for a particular laboratory and population. Knowledge of the ethnic background of the population on what the method will be applied should be desirable. It is therefore essential that there are more studies to assess the validity of any *RHD* genotyping by PCR for a particular population. Brazilian population is of unique genetic diversity and we cannot classify the patients included in this study as true caucasian or black. The rules applied for interpretation of genotype in population of clear genetic background are not applicable to this population and to those with similar characteristics.

Fetal genotyping has its limitations and discrepancies between phenotypes and genotypes have been observed, even in qualified reference laboratories. This suggest that no single DNA-based technique can be offered as a reference method that can accommodate the great heterogeneity within the human Rh blood system (Flegel et al., 1998; Kroll et al., 2001). Individual laboratories should assess their own level of accuracy to ensure better management scheme for HDFN. In our laboratory we observed a total concordance rate of 97.3%. Similar concordance rate of 97.8% was observed by Johnson et al. (2003), using multiple exons (exon 4, 5 and 10) in a

conventional multiplex PCR. Other conventional PCR reached 100% of concordance as in Faas et al. (1998) using exon 7, and Nelson et al. (2001) using exon 10 in 26 RhD-positive fetuses. In contrast, Siva et al. (2003), amplifying exon 7 and exon 10, reached 80.8% of concordant results in 26 maternal samples.

Different studies of fetal *RHD* genotyping in maternal plasma used different methods, and it is difficult to compare them. Differences are present in the selection of the patients, subject's population, gestational ages, primer sets utilized, genes regions studied, PCR assays (conventional, multiplex, nested, real-time), and different protocols of samples preparation, DNA extraction and amplification. Most tests have been performed on people of European origin.

The real-time PCR, in addition to improving the sensitivity of the DNA detection, can also be used to measure the concentration of fetal DNA in maternal plasma, and carries a lower chance of contamination (Hattori et al., 1992). But the real-time PCR method is not widespread available. The conventional PCR can easily be performed in any laboratory that uses basic molecular biology techniques. It is a simple, accurate, rapid, non-radioactive, and inexpensive DNA-based method.

Bischoff et al. (1999) compared *RHD/CE*-PCR results between conventional and real-time methods, in plasma samples of 20 mothers bearing RhD-positive fetuses, amplifying exon 7 of both genes, and encountered a sensitivity of 62% with the real-time and only 50% with conventional PCR. We reached a sensitivity of 98.3%, probably because we used two sets of primers.

There are some technical difficulties associated with the PCR, for example the rate of amplification failure. We encountered a rate of 7.4% (6/81), similar to Siva et al. (2003) that used the conventional PCR to amplify exon 7 and exon 10 of the *RHD* and *RHCE* genes, and were incapable to amplify 7.1% of 28 maternal plasma samples (2/28). The same 7% rate of amplification failure was found by Smid et al. (1999), using the conventional Y-PCR for sexing 27 fetuses (2/27). Lower, but not absent, rates were observed by using the real-time PCR. Legler et al. (2002) reached a 2.8% of unsatisfactory amplification (1/36), and Randem et al. (2003), with a 5.3% rate (6/114).

Other potential technical problem of PCR is reflected by the rate of samples requiring repeated analysis. This information is lacking from most publications on fetal genotyping in maternal blood. In our study, 75% of the 81 samples required at least two PCR assays to reach satisfactory amplification results. Finning et al. (2002), by using real-time PCR, highlight the importance of using multiple replicate wells for detecting fetal DNA.

The lack of efficiency on detection probably reflects variable fetal DNA concentration in maternal plasma, and it could be due to DNA degradation by storage conditions or the instability of the PCR products. Efficiency and quality of DNA extraction are important factors that have a major influence on subsequent genotyping assays (Dhallan et al., 2004).

The stability of the blood samples and PCR products have also been studied. Finning et al. (2002) demonstrated by real-time PCR that blood samples processed more than 2 days after maternal venipuncture showed an increased level of total plasma DNA,

leading to a relative decrease in fetal DNA concentration, probably due to hemolysis of maternal cells and release of maternal DNA into the plasma. In addition, Randen et al. (2003) studying 10 maternal plasma samples submitted to 4 different storage conditions, concluded that time in transit of the samples would probably reduce the amount of fetal DNA. We can not exclude that our storage conditions and time to prepare these samples have compromised the quality and the quantity of fetally-derived DNA.

Incorrect typing of the fetuses should be avoided by all available means. Chan et al. (2001) advocate the use of several primers in separate reactions, in addition to performing complete family analysis in cases of Rh alloimmunized pregnancies. Van den Veyver and Moise Jr (1996) recommend the same family study, and the use of two sets of primers but in a single reaction. We used two regions of the *RHD* gene to eliminate partially the false-negative results, but it is known to be still unable to avoid false-positive results. We recognize that the inability to reassess the fetal and patient's family for new serologic type and genotyping is a limitation of our study.

In the false positive result obtained in the present study, just the *RHD* exon 10 was amplified. According to Finning et al. (2002), as this region of *RHD* is present in both *RHD* ψ and *RHD*, when just the exon 10 is amplified and no other *RHD* signals are obtained, the fetus should be predicted to be RhD-negative. So, our false-positive result could be explained by this intact but nonfunctional *RHD* (*RHD* Ψ) which has high frequency among Japanese (Okuda et al., 1997) and Africans (Daniels et al., 1997). Some authors indicate that all *RHD* genotyping in non-Caucasians individuals should take account of *RHD* Ψ (Aubin et al., 1997; Avent et al., 2000; Flegel and Wagner,

2000). Our population is in its majority from non-Caucasian origin. The potential “D variant” cause of false-positive result was not examined here with the present method. In addition, we could not reassess this family with fetal discrepant results in the RhD typing. Aware of the extreme sensitivity of PCR, we could not also exclude PCR contamination, although the exhaustive steps of anti-contamination measures used here.

False-negative results may be clinically more serious, leading to a delay or omission of intrauterine therapy. Our false negative case could be explained by the presence of possible hybrid genes (*RHD-CE-D^s*), as just the exon 10 *RHCE* gene region was amplified. Its important to note that the presence of fetal DNA in every sample cannot be confirmed, and an ideal internal control to confirm the presence of fetal DNA is not available yet. So, when an *RHD* signal is not detected, there remains the possibility that this is due to the lack of fetal DNA. The amount of cell-free fetal DNA is obviously a limiting factor for fetal *RHD* genotyping, especially in the first trimester of gestation. It could also explain our false-negative result.

There is no doubt that the maternal plasma-based noninvasive method to fetal genotyping has considerable merit and will be widespread soon. But, in the field of clinical management of HDFN, one must know if the tests are sensitive enough that they can be used in large-scale screening of D-negative pregnancies at the first antibody screen. At present, in all cases where an *RHD*-negative result is reported, other noninvasive diagnostic tool (as maternal antibody level, ultra-sonography and middle cerebral artery Doppler evaluation) should continue to be monitored throughout pregnancy. Legler et al. (2002) suggest that, currently, fetal *RHD* genotyping on maternal plasma should be reserved for difficult cases where fetal loss risk is

exceptionally high when amniocentesis is performed or an invasive procedure is otherwise contraindicated or has been refused by the patient.

In applying the *RHD* genotyping to clinical medicine, it is recommended that a result should be reported only when the analysis of distinct *RHD* regions are concordant (Crombach et al., 1997). We have demonstrated that the accuracy of isolated gene regions for the fetal genotyping is insufficient for clinical application (Table 2) in agreement with Johnson et al. (2003). The test result should be checked for methodological errors and clinical plausibility by specialists in molecular biology and fetal medicine, before the fetal *RHD* genotype is reported. Exhaustive analysis of the polymorphism, population frequency and distribution of the *RHD* alleles are required.

Acknowledgements: We thank Artemis Rodrigues and Karina A. Rosa for technical assistance.

References:

- Aubin J-T, Le Van Kim C, Mouro I, et al. 1997. Specificity and sensibility of RHD genotyping methods by PCR-based DNA amplification. *Br J Haematol* **98** : 356-64.
- Avent ND, Finning KM, Martin PG, Soothill PW. 2000. Prenatal Determination of Fetal Blood Group Status. *Vox Sang* **78** : 155-62.
- Benachi A, Steffann J, Gautier E, et al. 2003. Fetal DNA in maternal serum: does it persist after pregnancy? *Hum Genet* **113** : 76-9.
- Bennett PR, Le Van Kim C, Colin Y, et al. 1993. Prenatal Determination of Fetal RhD Type by DNA Amplification. *N Engl J Med* **329** : 607-10.
- Bischoff FZ, Nguyen DD, Marquéz-Do D, Moise Jr KJ, Simpson JL, Elias S. 1999. Noninvasive Determination of Fetal RhD Status Using Fetal DNA in Maternal Serum and PCR. *J Soc Gynecol Invest* **6**: 64-9.
- Bowman JM, Pollack JM. 1987. Failures of intravenous Rh immune globulin prophylaxis : an analysis of the reasons for such failures. *Transf Med Rev* **1**: 102-12.
- Castilho L, Rios M, Bianco C, et al. 2002. DNA-based typing for the management of multiply-transfused sickle cell disease patients. *Transfusion* **42**: 232-8.

Chan FY, Cowley NM, Wolter L, et al. 2001. Prenatal RHD gene determination and dosage analysis by PCR: clinical evaluation. *Prenat Diagn* **21** : 321-6.

Costa JM, Giovangrandi Y, Ernaut P, et al. 2002. Fetal *RHD* genotyping in maternal serum during the first trimester of pregnancy. *Br J Haematol* **119** : 255-60.

Cotorruelo C, Biondi C, Borrás SG, DiMónaco R, Racca A. 2002. Early detection of RhD status in pregnancies at risk of hemolytic disease of the newborn. *Clin Exp Med* **2** : 77-81.

Crombach G, Picard F, Beckmann M, Tutschek B, Bald R, Niederacher D. 1997. Fetal Rhesus D genotyping on amniocytes in alloimmunised pregnancies using fluorescence duplex polymerase chain reaction. *Br J Obstet Gynaecol* **104** : 15-9.

Crombach G, Niederacher D, Larbig D, et al. 1999. Reliability and clinical application of fetal RhD genotyping with two different fluorescent duplex polymerase chain reaction assays: Three years' experience. *Am J Obstet Gynecol* **180** : 435-40.

Daniels GL, Green C, Smart E. 1997. Differences between RhD-negative Africans and RhD-negative Europeans. *Lancet* **350** : 862-3.

Dhallan R, Au W-C, Mattagajasingh S, et al. 2004. Methods to Increase the Percentage of Free Fetal DAN Recovered from the Maternal Plasma. *JAMA* **291** : 1114-9.

Faas BHW, Beuling EA, Christiaens GCML, von dem Borne AEGKr, van der Schoot CE. 1998. Detection of fetal *RHD*-specific sequences in maternal plasma. *Lancet* **352** : 1196.

Finning KM, Martin PG, Soothill PW, Avent ND. 2002. Prediction of fetal D status from maternal plasma : introduction of a new noninvasive fetal *RHD* genotyping service. *Transfusion* **42** : 1079-85.

Flegel WA, Wagner FF, Müller TH, Gassner C. 1998. Rh phenotype prediction by DNA typing and its application to practice. *Transfusion* **8** : 281-302.

Flegel WA, Wagner FF. 2000. Molecular Genetics of RH. *Vox Sang* **78** (suppl 2): 109-15.

Hattori M, Yoshioka K, Sakaki Y. 1992. Highly sensitive fluorescent DNA sequencing and its application for detection and mass-screening of point mutations. *Electrophoresis* **13** : 60-5.

Hughes RG, Craig JIO, Murphy WG, Greer IA. 1994. Causes and clinical consequences of Rhesus(D) haemolytic disease of the newborn : a study of a Scottish population, 1985-1990. *Br J Obstet Gynaecol* **101** : 297-300.

Johnson L, McCracken AS, Morris JM, Woodland NB, Flower RL. 2003. Variation in the reliability of *RHD* antenatal genotyping using the polymerase chain reaction and targeting multiple exons of the *RHD* gene. *Vox Sang* **85** : 222-3.

Kroll H, Carl B, Santoso S, Bux J, Bein G. 2001. Workshop Report on the Genotyping of Blood Cell Alloantigens. *Transf Med* **11** : 211-9.

Legler TJ, Lynen R, Maas J-H, et al. 2002. Prediction of fetal Rh D and Rh CcEe phenotype from maternal plasma with real-time polymerase chain reaction. *Transf Apher Sci* **27** : 217-23.

Lighten AD, Overton TG, Sepulveda W, Warwick RM, Fisk NM, Bennett PR. 1995. *Am J Obstet Gynecol* **173** : 1182-5.

Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. 1997. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* **350** : 485-7.

Lo YMD, Hjelm NM, Filder C, et al. 1998a. Prenatal Diagnosis of Fetal RhD Status by Molecular Analysis of Maternal Plasma. *N Engl J Med* **339** : 1734-8.

Lo YMD, Tein MSC, Lau TK, et al. 1998b. Quantitative Analysis of Fetal DNA in Maternal Plasma and Serum: Implications for Noninvasive Prenatal Diagnosis. *Am J Hum Genet* **62**: 768-75.

Lo YMD, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AMZ, Hjelm NM. 1999. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* **64** : 218-24.

Moise Jr KJ. 2002. Management of Rhesus Alloimmunization in Pregnancy. *Obstet Gynecol* **100** : 600-11.

Nelson M, Eagle C, Langshaw M, Popp H, Kronenberg H. 2001. Genotyping fetal DNA by non-invasive means: extraction from maternal plasma. *Vox Sang* **80** : 112-6.

Okuda H, Kawano M, Iwamoto S, et al. 1997. The RHD gene is highly detectable in RhD negative Japanese donors. *J Clin Invest* **100** : 373-9.

Okuda H, Kajii E. 2002. The evolution and formation of *RH* genes. *Legal Med* **4**:139-55.

Pellegrino Jr. J, Castilho L, Rios M, Souza CA. 2001. Blood Group Genotyping in a Population of Highly Diverse Ancestry. *J Clin Lab Anal* **15** : 8-13.

Pertl B, Pieber D, Panzitt T, et al. 2000. RhD genotyping by quantitative fluorescent polymerase chain reaction : a new approach. *Br J Obstet Gynaecol* **107** : 1498-502.

Portmann C, Ludlow J, Joyce A, Chan FY. 1997. Antecedents to and Outcomes of Rh(D) Immunization: Mater Mothers Hospital, Brisbane, 1988-1995. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* **37** : 1-12.

Randen I, Hauge R, Kjeldsen-Kragh J, Fagerhol MK. 2003. Prenatal genotyping of *RHD* and *SRY* using maternal blood. *Vox Sang* **85** : 300-6.

Rijnders RJP, Christiaens GCML, Bossers B, van der Smagt JJ, van der Schoot CE, Haas M. 2004. Clinical Applications of Cell-Free Fetal DNA From Maternal Plasma. *Obstet Gynecol* **103** : 157-64.

Simsek S, Bleeker PMM, von dem Borne AEGK. 1994. Prenatal Determination of Fetal RhD Type. *N Engl J Med* **330** : 795.

Singleton BK, Green CA, Avent ND, et al. 2000. The presence of na RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the RhD-negative blood group phenotype. *Blood* **95** : 12-8.

Siva SC, Johnson SI, McCracken AS, Morris JM. 2003. Evaluation of the clinical usefulness of isolation of fetal DNA from the maternal circulation. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* **43** : 10-5.

Smid M, Lagona F, Benasuti L, et al. 1999. Evaluation of Different Approaches for Fetal DNA Analysis from Maternal Plasma and Nucleated Blood Cells. *Clin Chem* **45**:1570-2.

Spence WC, Maddalena A, Demers DB, Bick DP. 1995. Molecular Analysis of the RhD Genotype in Fetuses at Risk for RhD Hemolytic Disease. *Obstet Gynecol* **85** : 296-8.

Stangenberg M, Selbing A, Lingman G, Westgren M. 1991. Rhesus immunization : new perspectives in maternal-fetal medicine. *Obstet Gynecol Surv* **46**: 189-95.

Urbaniak SJ, Greiss MA. 2000. RhD haemolytic disease of the fetus and the newborn. *Blood Rev* **14** : 44-61.

Van den Veyver IB, Moise Jr KJ. 1996. Fetal RhD typing by polymerase chain reaction in pregnancies complicated by Rhesus alloimmunization. *Obstet Gynecol* **88** : 1061-77.

Van den Veyver IB, Subramanian SB, Hudson KM, Werch J, Moise Jr. KJ, Hughes MR. 1996. Prenatal Diagnosis of the RhD Fetal Blood Type on Amniotic Fluid by Polymerase Chain Reaction. *Obstet Gynecol* **87** : 419-22.

Zhang J, Filder C, Murphy MF, et al. 2000. Determination of Fetal RhD Status by Maternal Plasma DNA Analysis. *An N Y Acad Sci* **906** : 153-5.

Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. 2001. Risk free simultaneous prenatal identification of fetal Rhesus D status and sex by multiplex real-time PCR using cell free DNA in maternal plasma. *Swiss Med Wkly* **131** : 70-4.

Table 1: Fetal *RHD* genotyping on the maternal plasma by allele-specific PCR at different trimesters of gestation. (N=75)

Trimester	Number	RhD-positive fetuses		RhD-negative fetuses	
		PCR RHD-pos	PCR RHD-neg	PCR RHD-pos	PCR RHD-neg
First	15	10	1	-	4
Second	34	29	-	-	5
Third	26	19	-	1	6
Total	75	58	1	1	15

Table 2: Comparison of the accuracy values of the intron 4 and exon 10 conventional PCR on maternal plasma in determining fetal RhD status.

	Intron 4	Exon 10
Sensitivity (%)	98.2	100
Specificity (%)	69.2	26.4
Positive predictive value (%)	87.1	14.5
Negative predictive value (%)	94.7	100
Concordance rate (%) *	88.9	34.5

* The number of fetuses correctly genotyped divided by the total number of samples

4. Conclusões

- A genotipagem *RHD* fetal através da análise do plasma materno para a identificação do antígeno RhD na população estudada obteve valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos negativo e positivo correspondentes aos encontrados na literatura.
- A taxa de concordância entre os resultados da genotipagem *RHD* fetal pela análise do plasma materno, e da tipagem RhD do recém-nascido no período neonatal em sangue periférico, permite que este teste seja usado para predição não invasiva do fenótipo RhD fetal na nossa população.
- Aprimoramentos técnicos como protocolos rígidos de estocagem e processamento das amostras, adição de mais regiões gênicas e pesquisa do *RHD Ψ* , poderiam conferir ao método mais confiabilidade.

5. Referências Bibliográficas

ACOG- AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS. **Prevention RhD alloimmunization.** ACOG Practice bulletin no. 4. Washington, DC: American College of Obstetrician and Gynecologists, 1999.

ADAMS, M.M.; MARKS, J.S.; GUSTAFSON, J.; OAKLEY JR, G.P. Rh hemolytic disease of the newborn: using incidence observations to evaluate the use of Rh immune globulin. *Am J Public Health*, 71:1031-5, 1981.

AGRE, P.; CARTRON, J-P. Molecular Biology of the Rh Antigens. *Blood*, 78:551-63, 1991.

AL-MUFTI, M.; HOWARD, C.; OVERTON, T.; HOLZGREVE W.; GANSHIRT, D.; FISK, N.M.; et al. Detection of fetal messenger ribonucleic acid in maternal blood to determine fetal RhD status as a strategy for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Obstet Gynecol*, 179:210-4, 1998.

ARIGA, H.; OHTO, H.; BUSCH, M.P.; IMAMURA, S.; WATSON, R.; REED, W.; et al. Kinetics of fetal cellular and cell-free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Transfusion*, 41:1524-30, 2001.

ARTLETT, C.M.; SMITH, J.B.; JIMENES, S.A. Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. **N Engl J Med**, 338:1186-91, 1998.

AUBIN, J-T.; LE VAN KIM, C.; MOURO, I.; COLIN, Y.; BIGNOZZI, C.; BROSSARD, Y., et al. Specificity and sensitivity of RHD genotyping methods by PCR-based DNA amplification. **Br J Haematol**, 98:356-64, 1997.

AVENT, N.D.; FINNING, K.M.; MARTIN, P.G.; SOOTHILL, P.W. Prenatal Determination of fetal blood group status. **Vox Sang**, 78(suppl 2):155-62, 2000.

BENACHI, A.; STEFFANN, J.; GAUTIER, E.; ERNAULT, P.; OLIVI, M.; DUMEZ, Y.; et al. Fetal DNA in maternal serum: does it persist after pregnancy? **Hum Genet**, 113:76-9, 2003.

BENNETT, P.R.; LE VAN KIM, C.; COLIN, Y.; WARWICK, R.M.; CHÉRIF-ZAHAR, B.; FISK, N.M.; et al. Prenatal determination of fetal RhD type by DNA amplification. **N Engl J Med**, 329:607-10, 1993.

BIANCHI, D.W. Fetal DNA in maternal plasma: the plot thickens and the placental barrier thins. **Am J Hum Genet**, 62:763-4, 1998.

BIANCHI, D.W.; ZICKWOLF, G.K.; WEIL, G.J.; SYLVESTER, S.; DEMARIA, M.A. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. **Proc Natl Acad USA**, 93:705-8, 1996.

BIANCHI, D.W.; LESHANE, E.; ANGERT, R.; TANTRAVAHU, U.; COWAN, J.M. Thoughts on the origin of fetal DNA in the pregnant woman. **Fetal Diagn Ther**, 16:450, 2001.

BISCHOFF, F.Z.; NGUYEN, D.D.; MARQUÉZ-DO, D.; MOISE JUNIOR, K.J.; SIMPSON, J.L.; ELIAS, S. Noninvasive determination of fetal RhD status using fetal DNA in maternal serum and PCR. *J Soc Gynecol Invest*, 6:64-9, 1999.

BLAKEMORE, K.J.; BAUMGARTEN, A.; SCHOENFELD-DIMAIO, M.; HOBBS, J.C.; MASON, E.A.; MAHONEY, M.J. Rise in maternal serum α -fetoprotein concentration after chorionic villus sampling and the possibility of isoimmunization. *Am J Obstet Gynecol*, 155:988-93, 1986.

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*, 46:1078-84, 2000.

BOWMAN, J.M. Treatment options for the fetus with alloimmune hemolytic disease. *Trans Med Rev*, 4:191-207, 1990.

BOWMAN, J.M.; CHOWN, B.; LEWIS, M. Rh isoimmunization during pregnancy: antenatal prophylaxis. *Can Med Assoc J*, 118:623-7, 1978.

BOWMAN, J.M.; POLLACK, J.M. Failures of intravenous Rh immune globulin prophylaxis: an analysis of the reasons for such failures. *Transf Med Rev*, 1: 102-12, 1987.

BOWMAN, J.M. Antenatal suppression of Rh alloimmunization. *Clin Obstet Obstet Gynecol*, 34:296-303, 1991.

CABRAL, A.C.V.; TAVEIRA, M.R.; LOPES, A.P.B.M.; PEREIRA, A.K.; LEITE, H.V. Transfusão intra-uterina na isoimunização materna pelo fator Rh.. *RBGO*, 23:299-303, 2001.

CANNON, M.; JONES, P.B.; MURRAY, R.M. Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analysis review. **Am J Psychiatry**, 159:1080-92, 2002.

CARTRON, J-P. Defining the Rh blood group antigens. Biochemistry and molecular genetics. **Blood Rev**, 8:199-212, 1994.

CARTRON, J-P. RH blood group system and molecular basis of Rh-deficiency. **Baillieres Best Pract Res Clin Haematol**, 12:655-89, 1999.

CASTILHO, L.; RIOS, M.; BIANCO, C.; PELLEGRINO JUNIOR.; ALBERTO, F.L.; SAAD, S.T.O. et al. DNA-based typing for the management of multiply-transfused cell disease patients. **Transfusion**, 42:232-8, 2002.

CHAN, F.Y.; COWLEY, N.M.; WOLTER, L.; STONE, M.; CARMODY, F.; SAUL, A. et al. Prenatal RHD gene determination and dosage analysis by PCR : clinical evaluation. **Prenat Diagn**, 21:321-6, 2001.

CHAN, K.C.; ZHANG, J.; HUI, A.B.; WONG, N.; LAU, T.K.; LEUNG, T.N. et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. **Clin Chem**, 50:88-92, 2004.

CHEN, X.Q.; STROUN, M.; MAGNENAT, J.L.; NICOD, L.P.; KURT, A.M.; LYAUTEY, J. et al. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. **Nat Med**, 2:1033-5, 1996.

CHÉRIF-ZAHAR, B.; MATTEI, M.G.; LE VAN KIM, C.; BAILLY, P.; CARTRON, J-P. Localization of the human Rh blood group gene structure to chromosome region 1p34.3-1p36.1 by in situ hybridization. **Hum Genet**, 86:398-400, 1991.

CHITRIT, Y.; CAUBEL, P.; LUSINA, D.; BOULANGER, M-C.; BALLEDDENT, F.; SCHWINTÉ, A.L. et al. Detection and measurement of fetomaternal hemorrhage following diagnostic cordocentesis. **Fetal Diagn Ther**, 13:253-6, 1998.

CIANCIARULLO, M.A.; CECCON, M.E.J.; VAZ, F.A.C. Prevalência de marcadores imuno-hematológicos em recém-nascidos ao nascimento e em suas respectivas mães e incidência de doença hemolítica numa maternidade de São Paulo. **Rev Assoc Med Bras**, 49:45-53, 2003.

COLIN, Y.; CHÉRIF-ZAHAR, B.; LE VAN KIM, C.; RAYNAL, V.; VAN HUFFEL, V.; CARTRON, J-P. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. **Blood**, 78:2747-52, 1991.

CONTRERAS M. The prevention of Rh haemolytic of the fetus and newborn – general background. **Br J Obstet Gynaecol**, 105(suppl 18):7-10, 1998.

COSTA, J-M.; GIOVANGRANDI, Y.; ERNAULT, P.; LOHMANN, L.; NATAF, V.; HALALI, N.E. et al. Fetal *RHD* genotyping in maternal serum during the first trimester of pregnancy. **Br J Haematol**, 119:255-60, 2002.

COTORRUELO, C.; BIONDI, C.; BORRÁS, S.G.; DI MÓNACO, R.; RACCA, A. Early detection of RhD status in pregnancies at risk of hemolytic disease of the newborn. **Clin Exp Med**, 2:77-81, 2002.

CROMBACH, G.; PICARD, F.; BECKMANN, M.; TUTSCHEK, B.; BALD, R.; NIEDERACHER, D. Fetal Rhesus D genotyping on amniocytes in alloimmunised pregnancies using fluorescence duplex polymerase chain reaction. **Br J Obstet Gynaecol** 104:15-9, 1997.

CROMBACH, G.; NIEDERACHER, D.; LARBIG, D.; PICARD, F.; TUTSCHEK, B.; BECKMANN, M. et al. Reliability and clinical application of fetal RhD genotyping with two different fluorescent duplex polymerase chain reaction assays: Three years' experience. *Am J Obstet Gynecol*, 180:435-40, 1999.

DANIELS, G.L.; GREEN, C.; SMART, E. Differences between RhD-negative africans and RhD-negative europeans. *Lancet*, 350:862-3, 1997.

DANIELS, G.L.; ANSTEE, D.J.; CARTRON, J.P.; DAHR, W.; FLETCHER, A.; GARRATTY, G. et al. International Society of Blood Transfusion working party on terminology for red cell surface antigens: Vienna report. *Vox Sang*, 84:244-7, 2003.

DHALLAN, R.; AU, W-C.; MATTAGAJASINGH, S; EMCHE, S.; BAYLISS, P.; DAMEWOOD, M. et al. Methods to increase the percentage of free fetal DNA recovered from the maternal plasma. *JAMA*, 291:1114-9, 2004.

DIAMOND, L.K.; BLACKFAN, K.D.; BATY, J.M. Erythroblastosis fetalis and its association with universal edema of the fetus, icterus gravis neonatorum and anemia of the newborn. *J Pediatr*, 1:269-309, 1932.

FAAS, B.H.W.; BEULING, E.A.; CHRISTIAENS, G.C.M.L.; VON DEM BORNE, A.E.G.Kr.; VAN DER SCHOOT, C.E. Detection of fetal RHD-specific sequence in maternal plasma. *Lancet*, 352:1196, 1998.

FINNING, K.M.; MARTIN, P.G.; SOOTHILL, P.W.; AVENT, N.D. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping. *Transfusion*, 42:1079-85, 2002.

FLEGEL, W.A.; WAGNER, F.F; MULLER, T.H.; GASSNER, C. Rh phenotype prediction by DNA typing and its application to practice. *Transfusion*, 8:281-302, 1998.

FLEGEL, W.A.; WAGNER, F.F. Molecular genetics of RH. **Vox Sang**, 78(suppl 2):109-15, 2000.

FOURNIE, G.J.; MARTRES, F.; POURRAT, J.P.; ALARY, C.; RUMEAU, M. Plasma DNA as cell death marker in elderly patients. **Gerontology**, 39:215-21, 1993.

GAHMBERG, C.G. Molecular identification of the human Rh₀(D) antigen. **FEBS [Lett]**, 140:93-7, 1982.

GASSNER, C.; SCHMARDA, A.; KILGA-NOGLER, S.; JENNY-FELDKIRCHER, B.; RAINER, E.; MÜLLER, T.H. et al. *RHD/CE* typing by polymerase chain reaction using sequence-specific primers. **Transfusion**, 37:1020-6, 1997.

GEIFMAN-HOLTZMAN, O.; BERNSTEIN, I.M.; BERRY, S.M.; HOLTZMAN, E.J.; VADNAIS, T.J.; DEMARIA, M.A. et al. Fetal RhD genotyping in fetal cells flow-sorted from maternal blood. **Am J Obstet Gynecol**, 174:818-22, 1996.

GHIDINI, A.; SEPULVEDA, W.; LOCKWOOD, C.J.; ROMERO, R. Complications of fetal blood sampling. **Am J Obstet Gynecol**, 168:1339-44, 1993.

GUSSIN, H.A.E.; ELIAS, S. Culture of fetal cells from maternal blood for prenatal diagnosis. **Hum Reprod Update**, 8:523-7, 2002.

HAHN, S.; ZHONG, X.Y.; BURK, M.R.; TROEGER, C.; KANG, A.; HOLZGREVE, W. Both maternal and fetal cell-free DNA in plasma fluctuate. **Ann NY Acad Sci**, 945:141-4, 2001.

HAMLINGTON, J.; CUNNINGHAM, J.; MASON, G.; MUELLER, R.; MILLER, D. Prenatal detection of rhesus D genotype. **Lancet**, 349: 540, 1997.

HATTORI, M.; YOSHIOKA, K.; SAKAKI, Y. Highly sensitive fluorescent DNA sequencing and its application for detection and mass-screening of point mutations. *Electrophoresis*, 13:560-5, 1992.

HERZENBERG, L.A.; BIANCHI, D.W.; SCHRODER, J.; CANN, H.M.; IVERSON, G.M. Fetal cells in the blood of pregnant women : detection and enrichment by fluorescence-activated cell sorting. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76:1453-5, 1979.

HOWARD, H.; MARTLEW, V.; McFADYEN, I.; MARTLEW, W.; McFADGEN, I.; CLARKE, C. et al. Consequences for fetus and neonate of maternal red cell alloimmunisation. *Arch Dis Child*, 78:62-6, 1998.

HUANG CH. Molecular insights into the Rh protein family and associated antigens. *Curr Opin Hematol*, 4:94-103, 1997.

HUGHES, R.G.; CRAIG, J.I.O.; MURPHY, W.G.; GREER, I.A. Causes and clinical consequences of Rhesus(Rh) haemolytic disease of the newborn: a study of a Scottish population, 1985-1990. *Br J Obstet Gynaecol*, 101:297-300, 1994.

JOHNSON, L.; McCracken, S.A.; MORRIS, J.M.; WOODLAND, N.B.; FLOWER, R.L. Variation in the reliability of *RHD* antenatal genotyping using the polymerase chain reaction and targeting multiple exons of the *RHD* gene. *Vox Sang*, 85:222-3, 2003.

KROLL, H.; CARL, B.; SANTOSO, S.; BUX, J.; BEIN, G. Workshop Report on the Genotyping of Blood Cell Alloantigens. *Transf Med*, 11:211-9, 2001.

LAMBIN, P.; DEBBIA, M.; PUILANDRE, P.; BROSSARD, Y. IgG1 and IgG3 anti-D in maternal serum and on the RBCs of infants suffering from HDN: relationship with the severity of the disease. *Transfusion*, 42:1537-46, 2002.

LEGLER, T.J.; LYNEN, R.; MAAS, J-H.; PINDUR, G.; KULENKAMPFF, D.; SUREN, A. et al. Prediction of fetal Rh D and Rh CcEe phenotype from maternal plasma with real-time polymerase chain reaction. **Transfus Apheresis Sci**, 27:217-23, 2002.

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**, 89:10925-9, 1992.

LEWIS, D.E.; SCHOBER, W.; MURRELL, S.; NGUYEN, D.; SCOTT, J.; BOINOFF, J. et al. Rare event selection of fetal nucleated erythrocytes in maternal blood by flow cytometry. **Cytometry**, 23:218-27, 1996.

LIGHTEN, A.D.; OVERTON, T.G.; SEPULVEDA, W.; WARWICK, R.M.; FISK, N.M.; BENNETT, P.R. Accuracy of prenatal determination of RhD type status by polymerase chain reaction with amniotic cells. **Am J Obstet Gynecol**, 173:1182-5, 1995.

LO, Y.M.D.; BOWELL, P.J.; SELINGER, M.; MACKENZIE, I.Z.; CHAMBERLAIN, P.; GILLMER, M.D.G. et al. Prenatal determination of fetal RhD status by analysis of peripheral blood of rhesus negative mothers. **Lancet**, 341:1147-8, 1993.

LO, Y.M.D.; LO, E.S.F.; WATSON, N.; NOAKES, L.; SARGENT, I.L., THILAGANATHAN, B. et al. Two-Way Cell Traffic Between Mother and Fetus : Biological and Clinical Implications. **Blood**, 88:4390-5, 1996.

LO, Y.M.D.; CORBETTA, N.; CHAMBERLAIN, P.F.; RAI, V.; SARGENT, I.L.; REDMAN, C.W.G. et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. **Lancet**, 350:485-7, 1997.

LO, Y.M.D.; HJELM, N.M.; FIDLER, C.; SARGENT, I.L.; MURPHY, M.F.; CHAMBERLAIN, P.F. et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. **N Engl J Med**, 339:1734-8, 1998a.

LO, Y.M.D.; TEIN, M.S.C.; LAU, T.K.; HAINES, C.J.; LEUNG, T.N.; POON, P.M.K. et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. **Am J Hum Genet**, 62:768-75, 1998b.

LO, Y.M.D. Fetal RhD genotyping from maternal plasma. **Ann Med** 31:308-12, 1999.

LO, Y.M.D.; ZHANG, J.; LEUNG, T.N.; LAU, T.K.; CHANG, A.M.Z.; HJELM, N.M. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. **Am J Hum Genet**, 64:218-24, 1999.

MAASKANT-VAN WIJK, P.A.; FAAS B.H.W.; RUIJTER, J.A.M.; OVERBEEKE, M.A.M.; VON DEM BORNE, A.E.G.Kr.; VAN RHENEN, D.J. et al. Genotyping of *RHD* by multiplex polymerase chain reaction analysis of six *RHD*-specific exons. **Transfusion**, 38:1015-21, 1998.

MAGALHÃES, C. G. **Velocidade máxima de fluxo na artéria cerebral média no diagnóstico da anemia fetal em gestantes isoimunizadas**. Botucatu. 2004. [Dissertação - Mestrado - Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP].

MARI, G. Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. **N Engl J Med**, 342:9-14, 2000.

MOISE JUNIOR, K. J. Management of Rhesus Alloimmunization in Pregnancy. **Obstet Gynecol**, 100:600-11, 2002.

MOORE, S.; WOODROW, C.E.; McCLELLAND, D.B.L. Isolation of membrane components associated with human red cell antigens Rh(D), (c), (E) and Fy^a. **Nature**, 295:529-31, 1982.

NELSON, M.; EAGLE, C.; LANGSHAW, M.; POPP, H.; KRONENBERG, H. Genotyping fetal DNA by non-invasive means: extraction from maternal plasma. **Vox Sang**, 80:112-6, 2001.

NICOLINI, U.; KOCHENOUR, N.K.; GRECO, P.; LETSKY, E.A.; JOHNSON, R.D.; CONTRERAS, M. et al. Consequences of fetomaternal haemorrhage after intrauterine transfusion. **BMJ**, 297:1379-81, 1988.

OKUDA, H.; KAWANO, M.; IWAMOTO, S.; TANAKA, M.; SENO, T.; OKUBO, Y. et al. The *RHD* gene is highly detectable in RhD-negative japanese donors. **J Clin Invest**, 100:373-9, 1997.

OKUDA, H.; KAJII, E. The evolution and formation of *RH* genes. **Legal Med**, 4:139-55, 2002.

PELLEGRINO JUNIOR, J.; CASTILHO, L.; RIOS, M.; DE SOUZA, C.A. Blood group genotyping in a population of highly diverse ancestry. **J Clin Lab Anal**, 15:8-13, 2001.

PERTL, B.; PIEBER, D.; PANZITT, T.; HAEUSLER, M.C.H.; WINTER, R.; TULUI, L. et al. RhD genotyping by quantitative fluorescent polymerase chain reaction: a new approach. **Br J Obstet Gynaecol**, 107:1498-502, 2000.

PERTL, B.; BIANCHI, D.W. Fetal DNA in Maternal Plasma: Emerging Clinical Applications. **Obstet Gynecol**, 98:483-90, 2001.

POISSONNIER, M.H.; BROSSARD, Y.; DEMEDEIROS, N.; VASSILEVA, J.; PARNET, F.; LARSEN, M. et al. Two hundred intrauterine exchange transfusions in severe blood incompatibilities. ***Am J Obstet Gynecol***, 161:709-13, 1989.

PORTMANN, C.; LUDLOW, J.; JOYCE, A.; CHAN, F.Y. Antecedents to and outcome of Rh(D) Immunization: Mater Mothers Hospital, Brisbane, 1988-1995. ***Aust NZJ Obstet Gynaecol***, 37:1-12, 1997.

RACE, R.R. Modern concepts of the blood group systems. ***Ann NY Acad Sci***, 127:884-91, 1965.

RANDEN, I.; HAUGE, R.; KJELDSEN-KRAGH, J.; FAGERHOL, M.K. Prenatal genotyping of *RHD* and *SRY* using maternal blood. ***Vox Sang***, 85:300-6, 2003.

RIJNDERS, R.J.P.; CHRISTIAENS, G.C.M.L.; BOSSERS, B.; VAN DER SMAGT, J.J.; VAN DER SCHOOT, C.E.; HAAS, M. Clinical applications of cell-free DNA from maternal plasma. ***Obstet Gynecol***, 103:157-64, 2004.

RODRIGUES, A. **Caracterização Molecular das variantes do sistema Rh em pacientes portadores de anemia falciforme**. Campinas. 2002. [Dissertação - Mestrado - Universidade Estadual de Campinas].

SCHUMACHER, B.; MOISE JUNIOR, K.J. Fetal transfusion for red blood cell alloimmunization in pregnancy. ***Obstet Gynecol***, 88:137-50, 1996.

SEKIZAWA, A.; WATANABE, A.; KIMURA, T.; SAITO, H.; YANAIHARA, T.; SATO, T. Prenatal diagnosis of the fetal RhD blood type using a single fetal nucleated erythrocyte from maternal blood. ***Obstet Gynecol***, 87:501-5, 1996.

SEKIZAWA, A.; KONDO, T.; IWASAKI, M.; WATANABE, A.; JIMBO, M.; SAITO, H. et al. Accuracy of fetal gender determination by analysis of DNA in maternal plasma. **Clin Chem**, 47:1856-8, 2001.

SIKOVANYECZ, J.; HORVÁTH, E.; SALLAY, É.; GELLÉN, J.; PÁL, A.; SZABÓ, J. Fetomaternal transfusion and pregnancy outcome after cordocentesis. **Fetal Diagn Ther**, 16:83-9, 2001.

SIMSEK, S.; BLEEKER, P.M.M.; VON DEM BORNE, A.E.G.K. Prenatal Determination of fetal RhD type. **N Engl J Med**, 330:795-8, 1994.

SINGLETON, B.K.; GREEN, C.A.; AVENT, N.D.; MARTIN, P.G.; SMART, E.; DAKA, A. et al. 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**, 95:12-8, 2000.

SIVA, S.C.; JOHNSON, S.I.; McCRACKEN, S.A.; MORRIS, J.M. Evaluation of the clinical usefulness of isolation of fetal DNA from the maternal circulation. **Aust NZJ Obstet Gynaecol**, 43:105, 2003.

SMID, M.; LAGONA, F.; de BENASSUTI, L.; FERRARI, M.; CREMONESI, L. Evaluation of different approaches for fetal DNA analysis from maternal plasma and nucleated cells. **Clin Chem**, 45:1570-2, 1999.

SPENCE, W.C.; MADDALENA, A.; DEMERS, D.B.; BICK, D.P. Molecular Analysis of the RhD genotype in fetuses at risk for RhD hemolytic disease. **Obstet Gynecol**, 85:296-8, 1995.

STANGENBERG, M.; SELBING, A.; LINGMAN, G.; WESTGREN, M. Rhesus immunization: new perspectives in maternal-fetal medicine. **Obstet Gynecol Surv**, 46:189-95, 1991.

- TANNIRANDORN, Y.; RODECK, C.H. New approaches in the treatment of haemolytic disease of the fetus. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*, 3:289-320, 1990.
- TROLLE, B. Prenatal Rh-immune prophylaxis with 300 mg immune globulin anti-D in the 28th week of pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 68:45-7, 1989.
- ULM, B.; SVOLBA, G.; ULM, M.R.; BERNASCHEK, G.; PANZER, S. Male fetuses are particularly affected by maternal alloimmunization to D antigen. *Transfusion*, 39:169-73, 1999.
- URBANIAK, S.J. Consensus conference on anti-D prophylaxis, April 7 and 8, 1997: final consensus statement. Royal College of Physicians of Edinburgh/Royal College of Obstetrician and Gynecologists. *Transfusion*, 38:97-9, 1998.
- URBANIAK, S.J.; GREISS, M.A. RhD haemolytic disease of the fetus and the newborn. *Blood Rev*, 14: 44-61, 2000.
- VAN DEN VEYVER, I.B.; MOISER JUNIOR, K.J. Fetal RhD typing by polymerase chain reaction in pregnancies complicated by Rhesus alloimmunization. *Obstet Gynecol*, 88:1061-7, 1996.
- VAN DEN VEYVER, I.B.; SUBRAMANIAN, S.B.; HUDSON, K.M.; WERCH, J.; MOISER JUNIOR, K.J.; HUGHES, M.R. Prenatal diagnosis of the RhD fetal blood type on amniotic fluid by polymerase chain reaction. *Obstet Gynecol*, 87:419-22, 1996.
- VAN WIJK, I.; HOON, A.C.; JURHAWAN, R.; TJOA, M.L.; GRIFFIOEN, S.; MULDER, M.A.M.; et al. Detection of Apoptotic Fetal Cells in Plasma of Pregnant Women. *Clin Chem*, 46:729-31, 2000.

WAGNER, F.F.; FLEGEL, W.A. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. **Blood**, 95: 3662-8, 2000.

WEINER, C.P.; OKAMURA, K. Diagnostic fetal blood sampling-technique related losses. **Fetal Diagn Ther**, 11:169-75, 1996.

WENK, R.E.; GOLDSTEIN, P.; FELIX, J.K. Kell alloimmunization, hemolytic disease of the newborn and perinatal management. **Obstet Gynecol**, 66:473-6, 1985.

YANKOWITZ, J.; LI, S.; MURRAY, J.C. Polymerase chain reaction determination of RhD blood type: an evaluation of accuracy. **Obstet Gynecol**, 86:214-7, 1995.

ZHANG, J.; FIDLER, C.; MURPHY, M.F.; CHAMBERLAIN, P.F.; SARGENT, I.L.; REDMAN, C.W.G. et al. Determination of fetal RhD status by maternal plasma DNA analysis. **An NY Acad Sci**, 906:153-5, 2000.

ZHONG, X.Y.; 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**, 107:766-9, 2000.

ZHONG, X.Y.; HOLZGREVE, W.; HAHN, S. Risk free simultaneous prenatal identification of fetal Rhesus D status and sex by multiplex real-time PCR using cell free fetal DNA in maternal plasma. **Swiss Med Wkly**, 131:70-4, 2001.

6. Bibliografia de Normatizações

FRANÇA, J.L.; BORGES, S.M.; VASCONCELLOS, A.C.; MAGALHÃES, M.H.A.
– **Manual para normatização de publicações técnico-científicas**. 4^a ed.,
Editora UFMG, Belo Horizonte, 1998. 213p.

Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Faculdade
de Ciências Médicas, UNICAMP. Ed. SAD – Deliberação CCPG-001/98
(alterada 2002).

7. Anexos

7.1. Anexo 1 – Ficha Clínica

“Genotipagem RHD fetal através da análise do plasma materno”

Idade: _____ anos

DUM: ____/____/____ G ____ P ____ A ____

Data do último parto: (mês/ano) ____/____

Filho prévio RhD-positivo: () não
() sim
() não sabe

Sensibilizada: () não () sim : Ag _____

Transfusão sangüínea:
() não
() sim

Tipagem Rh do marido: () positivo () negativo () desconhecida

Data	IG (DUM)	IG (US)
____/____/____		
____/____/____		

DPP (pelo US): ____/____/____

COLETAS DE SANGUE:

Nº	Data	IG (no dia da coleta)	Hb (g/dl)	GENOTIPAGEM PCR Resultado: RhD+ ou RhD-
1				
2				
3				

TÉRMINO DA GESTAÇÃO:
() parto () abortamento
IG: _____ semanas

TIPAGEM SANGÜÍNEA NEONATAL:RhD
() positivo () negativo

NOME: _____

DN: ____/____/____

SERVIÇO DE ORIGEM: _____

REGISTRO NO SERVIÇO DE ORIGEM: _____

ENDEREÇO: _____

TELEFONES: _____

7.2. Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____,
____ anos, RG _____, endereço _____,
telefone _____-_____, aceito colaborar como voluntária em um estudo que vai
tentar descobrir o tipo de sangue de bebês antes do nascimento, através de um exame de
sangue das grávidas. Os resultados deste estudo poderão ajudar no acompanhamento
pré-natal de grávidas com o tipo de sangue “negativo”, como o meu.

Fui informada que este exame de sangue não será prejudicial para mim ou para
o meu bebê, e também não me trará benefício imediato. Caso não queira participar ou
desista após ter concordado em participar, isso não prejudicará meu atendimento médico
atual ou futuro nas instituições envolvidas nesta pesquisa. Para isso, serão usadas
agulhas e seringas descartáveis para retirada de 5ml de sangue do meu braço, mesma
quantidade retirada em “exames de sangue de rotina”, podendo produzir dor e aparecimento
de “roxos” no local da picada.

Tenho direito a solicitar esclarecimentos de dúvidas sobre a pesquisa em qualquer
momento, contactando a Dra. Isabela pelo telefone (19) 9107 8800. Poderei também
contactar o Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP pelo telefone (19) 3788 8936.

Paciente:

(ou seu representante legal, RG: _____)

Dra. Isabela Nelly Machado:

Campinas, _____ de _____ de 20____

7.3. Anexo 3 – Sequência de primers utilizados na genotipagem RHD

Primers	Seqüências	Genbank
RHI41	5' -GTG TCT GAA GCC CTT CCA TC -3'	Y10604, Y10605
RHI42	5'-GAA ATC TGC ATA CCC CAG GC -3'	Y10604, Y10605
RHI43	5'ATT AGC TGG GCA TGG TGG TG 3'	Y10605
EX10F	5'-TTT CCT CAT TTG GCT GTT GGA TTT TAA -3'	X54534, LO8429
RHD3'-UTR	5'-GTA TTC TAC AGT GCA TAA TAA ATG GTG -3'	(Huang, 1996)
RHCE3'-UTR	5'-CTG TCT CTG ACC TTG TTT CAT TAT AC -3'	(Huang, 1996)

7.4. Anexo 4 - Tamanho Amostral

Para o cálculo do tamanho amostral consideramos que 55% da população RhD-positivo é heterozigota para a presença do gene *RHD* (LO, 1999), sendo que o feto de uma gestante RhD-negativo cujo fenótipo paterno é RhD-positivo heterozigoto tem chances iguais (50%) de ser RhD-positivo ou RhD-negativo.

Com base em uma amostra de 20 casos, ZHANG et al. (2000) estimaram uma especificidade de 95%, ou seja, um falso-negativo (1/20). Um intervalo de confiança para esta medida sugere que a especificidade, em uma população, esteja dentro do intervalo 0,75 – 0,9.

A determinação do tamanho amostral se baseou em buscar um número de casos capaz de gerar um intervalo de confiança de 95% exato para a especificidade com satisfatória precisão. Esta precisão se refere à amplitude do intervalo de confiança, ou seja, à diferença entre seus limites inferior e superior. Uma especificidade de 75% (limite inferior do intervalo de confiança do estudo de ZHANG et al. 2000) está associada a um intervalo de confiança de 95% com amplitude de 26%, para uma amostra de 50 casos. Já uma especificidade de 99% (limite superior do estudo de ZHANG et al., 2000) está associada a um intervalo de confiança de 95% com uma amplitude de 15%, para uma amostra de igual tamanho.

Assim, utilizamos uma amostra mínima de 50 casos, assumindo que a amplitude do intervalo de confiança foi, na pior das hipóteses, aproximadamente igual a 26%.