

DAPHNE RENATA TAVARES AMARAL

**DETERMINAÇÃO DO GENÓTIPO *RHD* FETAL
ATRAVÉS DO PLASMA MATERNO EM GESTANTES
RHD-NEGATIVO DE UMA POPULAÇÃO DO BRASIL**

Campinas

2010

DAPHNE RENATA TAVARES AMARAL

**DETERMINAÇÃO DO GENÓTIPO *RHD* FETAL ATRAVÉS
DO PLASMA MATERNO EM GESTANTES RHD-
NEGATIVO DE UMA POPULAÇÃO DO BRASIL**

Dissertação de mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lilian Maria de Castilho

Campinas

UNICAMP

2010

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Am13d Amaral, Daphne Renata Tavares
 Determinação do genótipo *RHD* fetal através do plasma materno em
 gestantes RhD-negativo de uma população do Brasil / Daphne
 Renata Tavares Amaral. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientador: Lilian Maria de Castilho
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Eritroblastose fetal. 2. Incompatibilidade de grupos
sanguíneos. 3. Antígenos de grupos sanguíneos. 4. Anticorpos. 5.
Plasma. 6. DNA. 7. Diagnóstico pré-natal. 8. Isoimunização Rh.
I. Castilho, Lilian Maria de. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Fetal *RHD* genotyping by analysis of maternal plasma in a population from Brazil

- Keywords:**
- Erythroblastosis fetal
 - Blood group incompatibility
 - Blood group antigens
 - Antibodies
 - Plasma
 - DNA
 - Prenatal diagnosis
 - Rh Isoimmunization

Titulação: Mestre em Clínica Médica

Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora:

Profa. Dra. Lilian Maria de Castilho
Profa. Dra. Eliana Martorano Amaral
Prof. Dr. José Mauro Kutner

Data da defesa: 30-08-2010

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Daphne Renata Tavares Amaral

Orientador: Prof^a. Dr^a. Lilian Maria de Castilho

Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Lilian Maria de Castilho

2. Prof^a. Dr^a. Eliana Martorano Amaral

3. Prof. Dr. José Mauro Kutner



Handwritten signatures in blue ink corresponding to the three members listed on the left. The first signature is for Lilian Maria de Castilho, the second for Eliana Martorano Amaral, and the third for José Mauro Kutner.

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30/08/2010

Trabalho realizado no Laboratório de Pesquisa em Hemoterapia do Hemocentro da Unicamp.

Esta pesquisa recebeu o apoio financeiro da FAPESP (Processo nº 2007/07151-3) e do CNPq, Brasil. O Centro de Hematologia e Hemoterapia - Hemocentro UNICAMP faz parte do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue, Brasil (INCT do Sangue – CNPq / MCT / FAPESP).

DEDICATÓRIA

DEDICO ESTE TRABALHO

A DEUS

PORQUE DELE, POR ELE E PARA ELE SÃO TODAS AS COISAS.

A ELE SEJA A GLÓRIA PARA SEMPRE!

***A TODOS OS BEBÊS E GESTANTES QUE SÃO ACOMETIDOS PELA DOENÇA HEMOLÍTICA
PERINATAL.***

***AOS MEUS ETERNOS PROFESSORES, FONTES INESGOTÁVEIS DE MOTIVAÇÃO, QUE SE
DEDICAM AO ENSINO, COMPARTILHANDO O CONHECIMENTO.***

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pelo dom da vida, por guiar o meu caminho e pela capacidade concedida para realizar mais esse sonho;

Aos professores **Lilian Castilho e Jordão**, a quem serei eternamente agradecida pela amizade, incentivo à pesquisa, apoio, desempenho profissional e por me orientar na trajetória desse novo caminho, proporcionando-me grandes oportunidades;

Aos meus pais, **Pimenta e Loude**, pelo amor, compreensão e por terem acreditado, aos meus irmãos, **Pablo e Deyse** e à minha grande amiga e colega de profissão, **Gabi's**, pela força e companheirismo;

A toda a equipe da **Unidade de Obstetrícia do CAISM**, em especial a Dr^a **Eliana Amaral** que permitiram a realização deste trabalho;

Aos professores **Ângela Luzo e Marcelo Addas** pelas importantes observações e contribuições na minha aula de qualificação;

Às meninas do laboratório **Daiane, Karina, Débora, Ariane** e as novas companheiras, **Gláucia, Daniela e Amanda** pelos abraços amigos e por estarem, sempre presente nas descontraídas tardes de trabalho;

À **Dú, Ucha** (Hemostasia), **Fernanda Moretto, Maria de Fátima Locatelli** (Imunohemato), **Andréia, João e Marcela** (Controle de qualidade) do Hemocentro-Unicamp pela assistência técnica;

A todos os meus **amigos de Campinas** especialmente à **família Heinrich** pelo companheirismo, abrigo, amizade, grandes petiscos e alívio nos momentos de tensão;

À **Gracy, Jhonathan, Lucas e pequena Isabela** pela motivação constante e pelas alegrias proporcionadas durante todo o tempo;

A **FAPESP** pelo financiamento desta pesquisa e ao **Hemocentro da Unicamp**, pela disposição do ambiente adequado para a realização do trabalho;

E a todos aqueles que presenciaram os momentos de luta e que contribuíram, a sua maneira, com esta conquista.

Muito Obrigada!!

EPIGRAFE

***AO DIA QUE PASSA, ESPERANÇA NO AMANHÃ
AOS LIVROS AINDA NÃO LIDOS, DESAPEGO ÀS COISAS VÃS
À FALTA DO CÉU ESTRELADO, LUZES SOBRE O MAR DA CIDADE
AO CORAÇÃO APERTADO, ALÍVIO NA ETERNIDADE***

CROMBIE

RESUMO

A análise de plasma materno para a determinação do genótipo *RHD* fetal é uma importante ferramenta no acompanhamento de gestantes RhD-negativo, especialmente em pacientes aloimunizadas. Este trabalho verificou a acurácia da genotipagem *RHD* fetal pela análise do plasma materno em uma população do Brasil. Foram analisadas 88 gestantes RhD-negativo entre 11 e 39 semanas de gestação, com idade mediana de 28 anos. Treze (14,78%) pacientes encontravam-se aloimunizadas com anti-D. Foram utilizados primers e sondas para detecção do gene *RHD* (exons 4, 5 e 10) por PCR em tempo real. Como controle interno, utilizou-se um conjunto de primers e sondas para identificar os genes *SRY* e *CCR5*. Sangue periférico ou sangue de cordão umbilical dos respectivos neonatos foram coletados durante o parto para a realização da fenotipagem RhD. A genotipagem *RHD* convencional foi realizada em todas as 88 amostras de DNA materno. Oitenta e três (94,32%) gestantes apresentaram a deleção do gene *RHD* e em 5 (5,68%) amostras foram identificadas variantes do gene *RHD* (3 *RHD Ψ* e 2 DFR). A genotipagem *RHD* convencional foi também realizada em 17 amostras de DNA paternas. Quinze amostras (88,24%) foram genotipadas como *RHD+* (5 *RHD+/RHD+* e 10 *RHD+/RHD-*) e 2 (11,76%), como *RHD-*. Cinquenta e oito (65,91%) fetos foram genotipados como *RHD+*. Vinte e sete (30,68%) amostras apresentaram ausência completa do gene *RHD* e três fetos apresentaram amplificação apenas para o exon 10, demonstrando a presença de uma possível variante *RHD Ψ* ou *RHD-CE-D^s*. Todos os resultados da genotipagem *RHD* fetal foram concordantes com a fenotipagem neonatal incluindo os 3 fetos com a variante *RHD*, fenotipados como RhD-. Nossos resultados indicam que a genotipagem *RHD* fetal através da análise do plasma materno amplificando 3 regiões do gene *RHD* (exons 4, 5 e 10) é adequada para a aplicação clínica. Este protocolo pode-se tornar prática em um futuro próximo.

ABSTRACT

Maternal plasma analysis for determination of the fetal *RHD* status is an important tool for the management of RhD-negative pregnant, specially alloimmunized women. We assessed the accuracy of fetal *RHD* genotyping by analysis of maternal plasma in a multi-ethnic population. We analyzed plasma samples from 88 RhD-negative pregnant women between 11 and 39 weeks of gestation, median age of 28 years old to determine the fetal *RHD* genotype. This population was from Southeastern Brazil with high mixed ethnic background. Thirteen patients (14,78%) had anti-D alloantibody. We used TaqMan primers and probes to detect exons 4, 5 and 10 of *RHD*, by real-time PCR. As internal controls, we used primers/probes sets to *SRY* and *CCR5*. Peripheral or umbilical cord bloods from respective neonates were collected during delivery and hemagglutination was performed. Conventional *RHD* genotyping was realized in all pregnant. Eighty-three patients had a deletion of *RHD* gene and five samples were identified *RHD* variants (3 *RHD* Ψ and 2 DFR). The conventional *RHD* genotyping was also performed on 17 DNA samples from fathers. Fifteen samples were genotyped as *RHD*⁺ (5 *RHD*⁺/*RHD*⁺ and 10 *RHD*⁺/*RHD*⁻) and 2 *RHD*-negative. Fifty-eight (65,91%) fetuses were genotyped as *RHD*⁺. Twenty-seven (30,68%) samples showed completely absence of *RHD* and three fetuses showed amplification only for the exon 10, demonstrating the presence of a possible variant (*RHD* Ψ or *RHD*-CE-D^s). All fetal *RHD* results agreed with the neonatal typing including the 3 fetuses with *RHD* variant, phenotyped as RhD-negative. Thus, the accuracy of the fetal *RHD* genotyping in this population was 100%. The earliest pregnancy in which fetal *RHD* was detected was 11 weeks. Our findings indicate that the accuracy of fetal *RHD* genotyping from maternal plasma using 3 regions (exons 4, 5 and 10) can be sufficient for clinical application in a multi-ethnic population. This knowledge helped us on the development of a feasible protocol for fetal *RHD* genotyping on DNA from maternal plasma in our population and should become practice in the near future.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Sigla	Descrição
°C	Grau Celsius
6-FAM	6-Carboxyfluorescein
anti-D	Anticorpo contra o antígeno D
Baseline	Linha de base
BSA	Albumina de soro bovino
CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
BVC	Biópsia de vilosidade coriônica
CCR5	Gene <i>CCR5</i>
CT	Ciclo limiar
D fraco	Alelo D fraco
D parcial	Alelo D parcial
dNTP	Desoxiribonucleotídeos
dATP	2'-deoxiadenina 5'-trifostato
dCTP	2'-deoxicitosina 5'-trifostato
dGTP	2'-deoxiguanina 5'-trifostato
dTTP	2'-deoxitimina 5'-trifostato
dUTP	2'-deoxiuracila 5'-trifostato
ddH₂O	Água deionizada e destilada
DHPN	Doença Hemolítica Perinatal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DO	Densidade óptica
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
Exon	Região do gene que codifica aminoácido
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Fem	Indivíduos de sexo feminino
FRET	Transferência de energia por ressonância de fluorescência
G	Gramas
HCl	Ácido clorídrico
HGH	Gene do hormônio do crescimento humano
IgG	Imunoglobulina G
Intron	Região do gene que não codifica aminoácido
KCl	Cloreto de potássio
Ladder	Marcador de peso molecular

LISTA DE ABREVIATURAS (CONTINUAÇÃO)

Sigla	Descrição
Masc	Indivíduos de sexo masculino
MCT	Ministério da Ciência e Tecnologia
mg	Miligrama
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
μM	Micromolar
mM	Milimolar
N^o	Número
ng	Nanogramas
nm	Nanômetro
NTC	No template control, Controle negativo sem a presença de DNA.
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR-ASP	Reação em cadeia da polimerase alelo-específica
PCR-RFLP	Análise dos fragmentos da digestão dos produtos da reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PPT	Tubo para preparação de plasma
Primers	Sequência de oligonucleotídeos sintéticos
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RHCE	Gene <i>RHCE</i>
RHD	Gene <i>RHD</i>
RhD	Antígeno RhD
RHD-CE-D^S	Gene híbrido <i>RHD-CE(3-8)-D^S</i>
RhD-negativo	Indivíduos portadores do fenótipo RhD(-)
RHDΨ	Pseudogene <i>RHD</i>
Rhlg	Imunoglobulina Rh
rpm	Rotações por minuto
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo
TAMRA	Carboxitetrametilrodamina
Taq DNA polimerase	Enzima DNA polimerase
TEB	Tris EDTA borato
TEMED	Tetrametiletilenediamina
Threshold	Limiar de fluorescência
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UDG	uracil DNA glicosilase
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
V	Volts

LISTA DE TABELAS

	Pág
Tabela 1: Seqüência de primers utilizados na genotipagem <i>RHD</i>	78
Tabela 2: Seqüência de primers utilizados na pesquisa de <i>RHD</i> fraco (DF1 a DF5) e <i>RHD</i> parcial (HMi).	78
Tabela 3: Seqüência de primers utilizados na pesquisa de <i>RHD</i> parcial	79
Tabela 4: Seqüência de primers utilizados na zigozidade <i>RHD</i>	79
Tabela 5: Seqüência de primers e sondas utilizados na genotipagem <i>RHD</i> fetal por PCR em tempo real.	80
Tabela 6: Análise da idade materna e da idade gestacional das gestantes incluídas no estudo.	83
Tabela 7: Análise do período gestacional estratificado em trimestres das gestantes incluídas no estudo.	83
Tabela 8: Resultado da pesquisa de anticorpos irregulares nas gestantes.	84
Tabela 9: Resultado da genotipagem <i>RHD</i> materna	85
Tabela 10: Resultado da genotipagem <i>RHD</i> paterna.	85
Tabela 11: Resultado da zigozidade <i>RHD</i> paterna.	86
Tabela 12: Concentração de primers e sondas para os genes <i>RHD</i> , <i>SRY</i> e <i>CCR5</i> estabelecidas após testes de padronização.	94
Tabela 13: Resultados da genotipagem <i>RHD</i> fetal estratificada por período gestacional.	95
Tabela 14: Critérios de interpretação do resultado da genotipagem <i>RHD</i> fetal de acordo com o padrão de amplificação das replicatas da reação.	96
Tabela 15: Critérios de interpretação do resultado da determinação do sexo fetal através da identificação do gene <i>SRY</i>	97
Tabela 16: Correlação dos resultados obtidos através da genotipagem <i>RHD</i> fetal no plasma materno com os resultados obtido através da fenotipagem RhD neonatal.	97
Tabela 17: Revisão bibliográfica de estudos de genotipagem <i>RHD</i> fetal por PCR em tempo real.	105

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1: Mecanismos moleculares que levam a presença e ausência do antígeno RhD na superfície da hemácia.	40
Figura 2: Gráfico explicativo do resultado final de uma amplificação por PCR em tempo real.....	45
Figura 3: Foto do gel de agarose para identificação do genótipo <i>RHD</i> e <i>RHD</i> pseudogene.....	68
Figura 4: Foto do gel de agarose da reação de PCR-ASP demonstrando amplificação para diversos tipos de <i>RHD</i> fraco.	69
Figura 5: Foto do gel de acrilamida das reações de PCR multiplex para identificação de genótipo <i>RHD</i> parcial.....	70
Figura 6: Foto do gel de agarose da reação de PCR-RFLP para determinação de zigosidade <i>RHD</i>	71
Figura 7: Curva de amplificação de reação teste de primers e sondas de PCR em tempo real.....	87
Figura 8: Amplificação da curva de concentração de primers de reação de PCR em tempo real por SYBR Green.....	88
Figura 9: Amplificação da curva de concentração de sonda de reação de PCR em tempo real.....	89
Figura 10: Curva de eficiência de reação de PCR em tempo real em singleplex..	91
Figura 11: Repetição da curva de eficiência de reação de PCR em tempo real em singleplex com TaqMan para o gene <i>CCR5</i>	92
Figura 12: Curva de eficiência de reação de PCR em tempo real em multiplex....	93

SUMÁRIO

	Pág
1. INTRODUÇÃO	29
2. OBJETIVOS	49
2.1. Objetivo Geral	51
2.2. Objetivos Específicos	51
3. MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.1. Metodologia da Pesquisa	55
3.2. Materiais	59
3.3. Métodos	63
4. RESULTADOS	81
4.1. Seleção de pacientes e dados coletados	83
4.2. Resultado da pesquisa de anticorpos irregulares no plasma materno	84
4.3. Resultados da genotipagem <i>RHD</i> materna	84
4.4. Resultados da genotipagem <i>RHD</i> paterna	85
4.5. Resultados da zigozidade <i>RHD</i> paterna	86
4.6. Resultados da padronização das reações por qPCR por TaqMan	86
4.7. Resultados da genotipagem <i>RHD</i> fetal por PCR em tempo real	94
5. DISCUSSÃO	99
6. CONCLUSÕES	109
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
8. APÊNDICE	123

1.INTRODUÇÃO

1.1. Doença Hemolítica Perinatal

A doença hemolítica perinatal (DHPN) é caracterizada pela destruição (hemólise) prematura de hemácias fetais devido à presença de anticorpos maternos da classe IgG formados por transfusões incompatíveis, gestações ou abortos prévios, que conseguem atravessar a membrana placentária e ocasionar anemia fetal (DANIELS *et al.*, 2004; MACHADO, 2004).

Os anticorpos IgG possuem a capacidade de atravessar a barreira placentária pela ligação a receptores Fc contidos nas células sinciciotrofoblásticas. As hemácias fetais recobertas por anticorpos são destruídas pelo sistema reticuloendotelial do feto, desencadeando um processo de hemólise imunomediada que resulta em anemia fetal (RODECK & WHITTLE, 2005). A diminuição da sobrevivência das hemácias inicia-se no período intra-uterino e avança até após o nascimento, porém, a severidade da doença pode variar desde casos assintomáticos com discretas alterações hematológicas até casos graves de morte fetal intra-uterina (LAMBIN *et al.*, 2002).

O transporte ativo de IgG tem início no segundo trimestre da gestação e avança até o nascimento (BRENNER *et al.*, 1998). Das quatro subclasses de IgG, IgG1 e IgG3 são mais eficientes na produção de hemólise eritrocitária que IgG2 e IgG4. Embora a subclasse IgG3 apresente um potencial maior para induzir fagocitose e aderência do monócito *in vitro*, a IgG1 tem maior influência na severidade da DHPN *in vivo* (RODECK & WHITTLE, 2005). Portanto, a subclasse do anticorpo na mãe pode afetar a gravidade da doença (KENNEDY & WAHEED, 2006).

O principal antígeno eritrocitário responsável pela DHPN é o antígeno D do sistema Rh devido a sua grande imunogenicidade e alta prevalência na população, embora outros grupos sanguíneos também estejam associados a esta patologia (RANDEN *et al.*, 2003; CASTILHO & PELLEGRINO, 2004, RODECK & WHITTLE, 2005). O antígeno D contribui com 60% dos casos de DHPN em fetos assintomáticos e 90% dos casos de anemia fetal grave (LAMBIN *et al.*, 2002).

Oitenta por cento dos indivíduos RhD-negativo que recebem transfusão de hemácias RhD-positivo formam anti-D. Gestantes RhD-negativo apresentam risco de aloimunização entre 10% e 17%, após uma gravidez de feto RhD-positivo, se a imunoglobulina Rh não for administrada adequadamente (BRENNER *et al.*, 1998; RODECK & WHITTLE, 2005; KENNEDY & WAHEED, 2006). Hemorragias fetomaternas durante a gestação podem causar aumento significativo nos títulos de anticorpos maternos, levando a maior gravidade da DHPN (KENNEDY & WAHEED, 2006).

O quadro clínico da DHPN é caracterizado por graus variáveis de anemia, de acordo com a intensidade da hemólise, determinando diversos mecanismos compensatórios (BAIOCHI & NARDOZZA, 2009). A destruição das hemácias fetais e a anemia resultante estimulam a rápida eritropoiese pela medula óssea do feto, podendo ser observada a presença de reticulócitos e eritroblastos na circulação fetal (RODECK & WHITTLE, 2005; KENNEDY & WAHEED, 2006). Na ocorrência de DHPN severa, a eritropoiese medular é insuficiente para compensar a hemólise. Assim, há o recrutamento de sítios extramedulares como fígado, baço, placenta e rins (RODECK & WHITTLE, 2005; FLEGEL *et al.*, 2007). A sobrecarga desses órgãos resulta em hepatoesplenomegalia, hipertensão porta, lesão hepatocelular, hiperbilirrubinemia e diminuição da produção de proteínas plasmáticas. A hipoproteinemia leva à redução da pressão osmótica coloidal do plasma e ao desequilíbrio da hemodinâmica, levando à ocorrência de insuficiência cardíaca, edema generalizado, derrames serosos e ascite – uma complicação conhecida como hidropsia (KENNEDY & WAHEED, 2006; BAIOCHI & NARDOZZA, 2009).

O processo de hemólise prossegue mesmo após o parto. A velocidade de destruição eritrocitária depois do nascimento diminui uma vez que não há entrada de mais anticorpos na circulação fetal através da placenta. Contudo, o anticorpo se distribui no espaço extravascular e intravascular, tendo meia-vida de 25 dias. Assim, a sensibilização e hemólise dos eritrócitos continuam durante alguns dias até semanas após o parto (KENNEDY & WAHEED, 2006). A hemoglobina liberada pela hemólise leva ao aumento dos níveis de bilirrubina não-

conjugada. Devido à comunicação entre a circulação feto-materna, os níveis aumentados de bilirrubina na circulação fetal e no líquido amniótico não causam doença clínica no feto, uma vez que esse produto é metabolizado no fígado materno. Após o nascimento, o acúmulo de subprodutos metabólicos da destruição das hemácias pode causar sérios problemas ao recém-nascido (KENNEDY & WAHEED, 2006). O fígado neonatal é incapaz de conjugar a quantidade aumentada de bilirrubina proveniente da hemólise. A bilirrubina não-conjugada pode atravessar a barreira hematoencefática e alcançar níveis tóxicos para o cérebro, levando ao quadro de encefalopatia bilirrubínica, conhecida por kernicterus (MIURA & DREBES, 1991; MOISE Jr, 2008).

Sem tratamento, 25 a 30% dos fetos são acometidos com algum grau de anemia hemolítica e hiperbilirrubinemia e 20 a 25% apresentam hidropsia severa que provavelmente resultam em óbito intra-uterino ou neonatal (MACHADO *et al.*, 2005; RODECK & WHITTLE, 2005). Os recém-nascidos sobreviventes à hidropsia apresentam seqüelas no desenvolvimento neuropsicomotor e diminuição de acuidade visual secundária ao dano cerebral (MOISE Jr, 2008).

A transfusão intra-uterina (TIU) é o principal tratamento atualmente disponível para a DHPN durante o período pré-natal (BOWMAN, 1991; MACHADO & BARINI, 2006). Essa terapêutica está indicada quando se identifica um quadro clinico-laboratorial de anemia grave (feto hidrópico e/ou hematócrito fetal abaixo de 30%). Esse procedimento visa manter o volume efetivo de eritrócitos no feto, até aumentar a chance de sobrevivência de vida extra-uterina (BRENNER *et al.*, 1998; RODECK & WHITTLE, 2005; SWEENEY & RIZK, 2005). Após o nascimento, a hiperbilirrubinemia grave pode ser tratada com exsanguíneo-transfusão (SWEENEY & RIZK, 2005) que visa remover anticorpos maternos e corrigir a anemia. Nos casos leves, pode-se utilizar a fototerapia que promove a fotoisomerização da bilirrubina, transformando-a em isômeros não-tóxicos que são eliminados nas fezes e na urina (MIURA & DREBES, 1991).

A imunoprofilaxia Rh (Rhlg) consiste em administrar imunoglobulina anti-D em mães RhD-negativo não aloimunizadas ao antígeno RhD. A administração da imunoglobulina RhD deve ocorrer preferencialmente até 72 horas após o parto de recém-nascido RhD-positivo e em situações onde houver risco de hemorragia feto-materna considerável (abortamento, gestação ectópica, gestação molar, procedimentos invasivos). Em adição, a profilaxia anti-D durante a gestação tem sido introduzida para prevenir a imunização durante a gravidez (DANIELS *et al.*, 2004; MURRAY & ROBERTS, 2007). No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda que toda gestante RhD-negativo não aloimunizada receba uma dose de imunoglobulina Rhlg entre a 28^a e 34^a semana de gestação e após situações de risco de hemorragia feto-materna, durante a gestação (BRASIL, 2000).

O uso adequado da imunoglobulina RhD evita a formação de anticorpos anti-D maternos, o que vem reduzindo drasticamente a prevalência de DHPN nas últimas décadas (URBANIACK, 1998; RANDEN *et al.*, 2003; RODECK & WHITTLE, 2005; MOISE Jr, 2008). Contudo, em países com limitação de recursos, a ausência de profilaxia anti-D pode chegar a 80% dos casos (BAIOCHI *et al.*, 2005). Em contrapartida, o uso da imunoglobulina humana pode ter alguns efeitos colaterais, como risco de transmissão de doença infecciosa, pelo fato de ser um derivado sangüíneo. Além disso, esse produto apresenta alto custo e tende à escassez visto que é obtido de indivíduos aloimunizados (RANDEN *et al.*, 2003). Adicionalmente, existe uma discussão ética quanto à imunização de indivíduos com produtos sanguíneos para produzir uma medicação que pode ser usada desnecessariamente em casos de gestação de fetos RhD-negativo (DANIELS *et al.*, 2009a).

Apesar da utilização da imunoprofilaxia, a doença hemolítica perinatal ainda contribui de maneira significativa para a morbimortalidade perinatal mesmo em países desenvolvidos (RODECK & WHITTLE, 2005). A descoberta e utilização da imunoprofilaxia anti-D levou a um decréscimo na incidência de DHPN de até 96% (ZHOU *et al.*, 2005; MURRAY & ROBERTS, 2007). Entretanto, após esse significativo decréscimo, a taxa tem se mantido constante devido ao tratamento

inadequado da gestante, falha na administração, falha no reconhecimento das situações clínicas de hemorragia materno-fetal, transfusão materna incompatível e sensibilização espontânea (HOWARD *et al.*, 1997; BAIOSCHI *et al.*, 2005).

O diagnóstico pré-natal e o tratamento do neonato em risco de desenvolver a DHPN requerem um trabalho cooperativo entre obstetra, hematologista e neonatologista (MURRAY & ROBERTS, 2007). Testes sorológicos e clínicos durante a gravidez podem identificar a presença e o título de anticorpo na circulação materna, definir o potencial do anticorpo como causador da DHPN e a gravidade da destruição eritrocitária.

A pesquisa de anticorpos irregulares (PAI) através do teste de Coombs indireto é capaz de detectar aloanticorpos clinicamente significativos como o anti-D. Se o resultado for negativo, é recomendável a repetição do teste entre 20^a e 24^a semana de gestação, e novamente por ocasião do parto (MOISE Jr, 1993; KENNEDY & WAHEED, 2006; MOISE Jr, 2008). Se o anticorpo anti-D é identificado na gestante RhD-negativo, deve-se realizar a titulação de anticorpo bem como a tipagem sanguínea RhD e zigosidade *RHD* paterna (KENNEDY & WAHEED, 2006).

A titulação de anticorpo materno é de grande importância no acompanhamento de gestantes aloimunizadas com risco de DHPN, por causa da associação bem estabelecida entre a concentração de anticorpo materno e a evolução da gravidez (RODECK & WHITTLE, 2005; MOISE Jr, 2008). Embora o título possa sofrer variação de acordo com o laboratório, metodologia e incidência de hidropsia, em geral considera-se os índices entre 8 e 32 como valor limítrofe (MOISE Jr, 1993; MOISE Jr, 2008). Títulos iguais ou inferiores a 16 devem ser repetidos mensalmente.

Para pacientes que apresentam um título limítrofe, indica-se a realização de testes fetais complementares uma vez que a titulação de anticorpos é apenas uma medida indireta da severidade da DHPN. Muitas pesquisas têm sido realizadas a fim de obter um método não-invasivo altamente indicativo de prognóstico perinatal das gestações complicadas por DHPN. Embora alguns sinais

ultra-sonográficos como ascite, hepatoesplenomegalia, derrames cavitários, poliidrânio e placentomegalia podem ser facilmente diagnosticados, esses sinais na maioria dos casos, são tardios (RODECK & WHITTLE, 2005; MOISE Jr, 2008).

O estudo do líquido amniótico visa a quantificação de bilirrubina amniótica, um indicador indireto do grau de hemólise fetal. Entretanto, tal propedêutica não oferece resultados fidedignos em idades gestacionais inferiores a 26 semanas e, portanto, recomenda-se que o acompanhamento dessas gestantes seja realizado por ultra-sonografia e pela dopplervelocimetria (NICOLAIDES *et al.*, 1986; RODECK & WHITTLE, 2005). No entanto, há indicação de análise de amostra de sangue fetal e, provavelmente, tratamento intra-uterino quando alterações ultra-sonográficas e/ou dopplerfluxométricas são detectadas antes da 26ª semana gestacional (MOISE Jr, 2008).

A obtenção de amostras de sangue fetal através da cordocentese permite a realização de importantes testes laboratoriais como a determinação do hematócrito, da hemoglobina fetal, do fenótipo RhD, contagem de reticulócitos e bilirrubina total (RODECK & WHITTLE, 2005; MOISE Jr, 2008). Entretanto, por se tratar de um procedimento invasivo pode resultar em perda fetal e/ou em hemorragia feto-materna, agravando o quadro-clínico da DHPN (MOISE Jr, 1993; MOISE Jr, 2008). A sensibilização materna por esses procedimentos pode chegar até 50% dos casos (RODECK & WHITTLE, 2005).

Atualmente, emprega-se a dopplervelocimetria na avaliação do pico de velocidade sistólica na artéria cerebral média (PVS-ACM) fetal para estimar o grau de anemia fetal. Este método tem se mostrado eficaz, seguro e não-invasivo, com acurácia superior ao estudo da densidade do líquido amniótico (RODECK & WHITTLE, 2005). Entretanto, para obter resultados reais, é necessário que o feto se encontre em um estado quiescente e, após 35 semanas de gestação, esse teste apresenta alto índice de resultados falso-positivos (MOISE Jr, 2008).

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 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* (MOLLISON *et al*, 1993), o feto de uma gestante RhD-negativo cujo pai é heterozigoto, tem 50% de chance de ser RhD-negativo, e neste caso, não apresenta risco de desenvolver a DHPN e não necessitaria da mesma abordagem invasiva que um feto RhD-positivo. Atualmente, através da determinação da zigosidade *RHD* é possível diferenciar, dentre os indivíduos RhD-positivo, indivíduos *RHD+/RHD+* homozigotos de indivíduos *RHD+/RHD-* heterozigotos. (WAGNER & FLEGEL, 2000; KENNEDY & WAHEED, 2006; RODECK & WHITTLE, 2005; MOISE Jr, 2008).

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 28^a semana de gestação e após situações de possível sensibilização pré-natal decorrente de procedimentos invasivos e sangramentos. Como mencionado anteriormente, este produto não é livre de riscos, além de ter custo ainda elevado para países com limitação de recursos financeiros.

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, seus riscos iatrogênicos e seu custo institucional (MACHADO, 2004; DANIELS, 2009a).

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 aloimunizar-se 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 através da genotipagem *RHD* fetal.

1.2. Sistema Rh

O sistema Rh é constituído por 50 antígenos (DANIELS *et al.*, 2009c), e apresenta alta complexidade incluindo a presença de muitas variantes. Os antígenos do sistema Rh são codificados pelos genes *RHD* e *RHCE* que compartilham 97% de homologia, estão organizados em 10 exons e localizados no cromossomo 1p34-p46.

Mutações de ponto, deleções, recombinações homólogas entre os dois genes e conversão gênica são os principais mecanismos moleculares envolvidos com o fenótipo RhD-negativo e com as variantes do sistema Rh (RANDEN *et al.*, 2003; WESTHOFF, 2004; FLEGEL, 2007; CHOU & WESTHOFF, 2009; DANIELS *et al.*, 2009a).

O fenótipo RhD negativo está presente em 15% da população Caucasiana, 3 a 5% em Africanos e é raro em Asiáticos. Em Caucasianos a causa mais comum do fenótipo RhD negativo é a deleção do gene *RHD* (RANDEN *et al.*, 2003; DANIELS *et al.*, 2004; MACHADO, 2004; WESTHOFF, 2004; FLEGEL, 2007; CHOU & WESTHOFF, 2009). Em Africanos, além da deleção, há duas variações genéticas para o fenótipo RhD negativo: o pseudogene *RHD* (*RHD* Ψ), uma inserção de 37 pb na seqüência do gene *RHD* que gera um stop códon e impede a síntese da proteína (SINGLETON *et al.*, 2000) e, a presença de um gene híbrido denominado *RHD-CE(3-8)-D^S*. O gene híbrido é composto pelos exons 1, 2 e extremidade 5' do exon 3 do gene *RHD*, extremidade 3' do exon 3, exon 4-8 do gene *RHCE* e exons 9 e10 do gene *RHD* (Figura 1).

Variantes do antígeno D que se expressam fracamente na membrana eritrocitária podem levar a errônea caracterização do fenótipo RhD-negativo enquanto que variantes que apresentam epítomos RhD alterados podem ser classificadas como RhD-positivo e levar à aloimunização. Estas variantes denominadas D fraco e D parcial devem ser analisadas na determinação do fenótipo RhD. Na variante D fraco, os epítomos estão expressos fracamente devido a alterações de nucleotídeos que levam a substituição de aminoácidos em

domínios de regiões intracelulares e transmembranares da proteína RhD e indivíduos portadores deste fenótipo geralmente não se aloimunizam. O antígeno D parcial é caracterizado pela ausência de epítomos devido a mutações ou rearranjos gênicos que alteram a seqüência de aminoácidos em regiões extracelulares da proteína Rh e, ao contrário do D fraco, indivíduos portadores do antígeno D parcial podem se aloimunizar quando expostos ao antígeno RhD normal que apresentam todos os epítomos (WESTHOFF, 2004; FLEGEL, 2007; CHOU & WESTHOFF, 2009; DANIELS *et al.*, 2009a).

A distinção sorológica entre os antígenos D fraco e D parcial de baixa densidade antigênica é muito difícil e mesmo com a grande variedade de soros monoclonais anti-D disponíveis ainda se classifica alguns D parciais como D fracos. No entanto, esta diferenciação é importante, em especial para pacientes e gestantes, pois pode auxiliar na conduta transfusional e na profilaxia Rh (DENOMME *et al.*, 2008). As técnicas de biologia molecular têm sido indicadas para esta finalidade e atualmente estão sendo amplamente utilizadas na definição das variantes *RHD* (FLEGEL & WAGNER, 2002; FLEGEL, 2009; POLIN *et al.*, 2009)

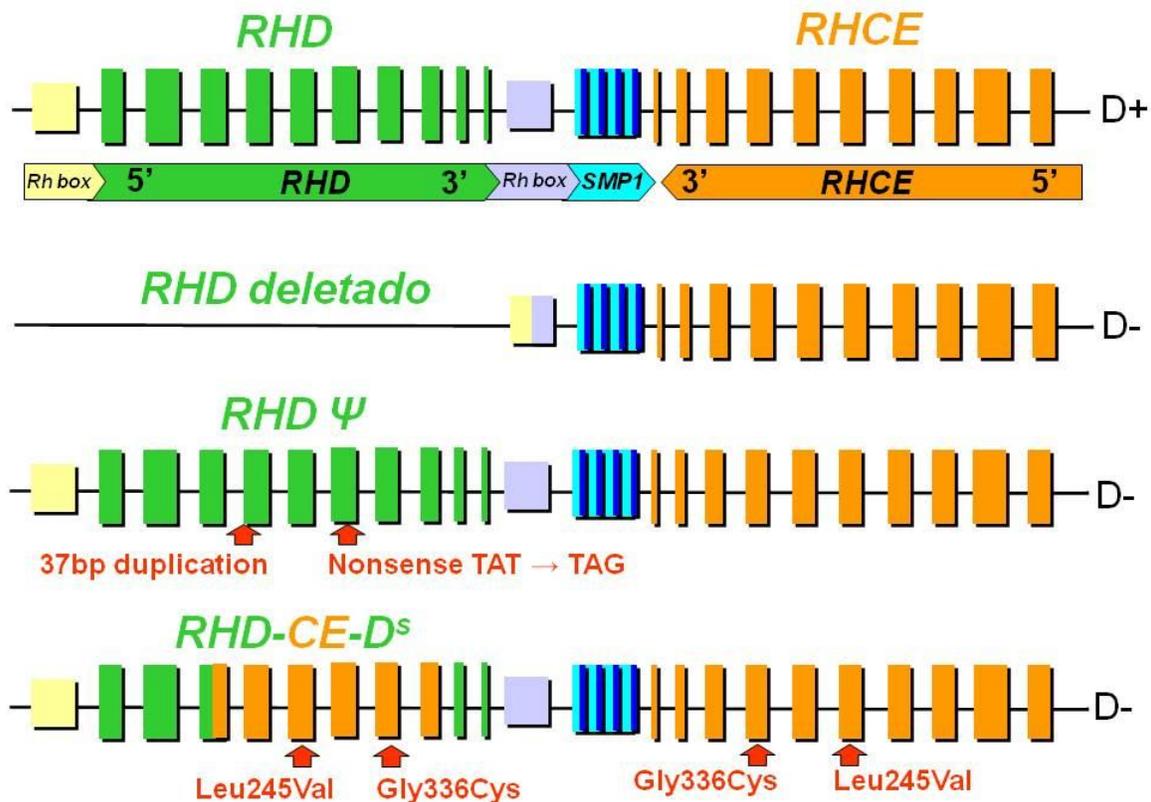


Figura 1: Mecanismos moleculares que levam a presença e ausência do antígeno RhD na superfície da hemácia. Adaptado de DANIELS et al., 2006

Após a elucidação das bases moleculares do sistema Rh, um grande número de métodos de genotipagem foi desenvolvido para sua determinação (AVENT & REID, 2000). Os métodos atuais de genotipagem *RHD* são baseados na técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) por amplificação de sequências específicas do gene *RHD*. A presença de genes híbridos, pseudogene *RHD* (*RHD Ψ*) e o grande número de variantes Rh pode dificultar a interpretação da genotipagem *RHD*. Considerando que a população brasileira apresenta alta miscigenação étnica e que estudos prévios na população de Campinas demonstraram a presença do pseudogene *RHD*, do gene *RHD* híbrido e das variantes D fraco e D parcial em amostras fenotipadas como RhD negativo (RODRIGUES *et al.*, 2002; RODRIGUES, 2005), a análise de duas ou mais

regiões do gene *RHD* torna-se necessária para se obter um resultado mais seguro.

1.3. Genotipagem fetal

O conhecimento do genótipo *RHD* fetal é de grande importância para o acompanhamento de gestantes RhD-negativo principalmente se esta for sensibilizada para o antígeno D. Se o feto for RhD-negativo, não há risco de ocorrência de DHPN, em contrapartida, se o feto for RhD-positivo há necessidade de maior atenção e acompanhamento (LO *et al.*, 1998b; MACHADO, 2004; WESTHOFF, 2004; DANIELS *et al.*, 2006).

A análise de DNA pode ser realizada por fontes de material genético fetal como sangue de cordão, células amnióticas, células trofoblásticas e células fetais. Entretanto, os procedimentos para obtenção dessas amostras são caros, invasivos e apresentam risco ao feto considerável (DANIELS *et al.*, 2004). Além disso, esses procedimentos podem levar a hemorragia materno-fetal em até 70% dos casos, o que pode agravar a sensibilização (RODECK & WHITTLE, 2005)

Vários testes baseados em reação em cadeia da polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction) para análise do DNA fetal já foram descritos. Após o primeiro relato por Bennett *et al.* (1993), a análise de DNA extraído de amniócitos e vilosidades coriônicas foi amplamente utilizada na determinação da genotipagem *RHD* fetal. Apesar dos altos índices de concordância, essa metodologia exige o uso dos procedimentos invasivos para obtenção de material biológico (LO *et al.*, 1998b; LO, 2001; MACHADO, 2004; DANIELS *et al.*, 2006).

O maior desafio do seguimento das gestantes RhD-negativo é como se evitar a abordagem invasiva desnecessária. Diante disto, vários pesquisadores têm concentrado esforços na investigação de uma metodologia para determinar o genótipo *RHD* fetal com o uso de DNA fetal isolado de sangue materno (DANIELS *et al.*, 2006; MACHADO *et al.*, 2006).

Já está bem estabelecido que, durante a gravidez, um pequeno número de células fetais nucleadas alcança a circulação materna. Esse transporte celular feto-materno oferece a possibilidade de obtenção não-invasiva de material fetal para análise genética. Contudo, a principal dificuldade é a quantidade mínima de células nucleadas no sangue materno. A limitada quantidade de células requer métodos ultra-sensíveis de detecção, o uso de técnicas de isolamento de células fetais como a separação de células por fluorescência ou a micromanipulação. Tais procedimentos são trabalhosos e caros para a utilização em larga-escala (LO, 2001). Diante dessa impossibilidade, LO *et al.* (1997) direcionaram suas pesquisas na investigação da presença de material genético fetal na porção acelular do sangue materno – o plasma. Esses pesquisadores conseguiram demonstrar a presença de DNA fetal livre no plasma materno em quantidade suficiente para os testes moleculares, através da identificação do gene *SRY* do cromossomo Y, presente em indivíduos masculinos. Estudos posteriores demonstraram que é possível identificar a presença de DNA fetal livre no plasma a partir de 38 dias de gestação (MOISE Jr, 2008). Entretanto a quantidade de DNA fetal encontrada antes da 8ª semana de gestação é insuficiente para realizar testes moleculares.

Atualmente, a descoberta da presença de DNA fetal livre no plasma materno aliada ao emprego de técnicas de biologia molecular permitiram a determinação do genótipo *RHD* fetal sem os riscos inerentes aos procedimentos invasivos (DANIELS *et al.*, 2004; WESTHOFF, 2004; MACHADO & BARINI, 2006).

Dados na literatura confirmam essa descoberta com diversos estudos com PCR convencional (FAAS *et al.*, 1998; NELSON *et al.*, 2001; JOHNSON *et al.*, 2003; SIVA *et al.*, 2003; MACHADO *et al.*, 2006) bem como o uso de uma técnica de PCR baseado em fluorescência - PCR em tempo real (LO *et al.*, 1998b; ZHANG *et al.*, 2000; ZHONG *et al.*, 2001; COSTA *et al.*, 2002; FINNING *et al.*, 2002; LEGLER *et al.*, 2002; RANDEN *et al.*, 2003; FINNING *et al.*, 2004; RIJNDERS *et al.*, 2004; ZHOU *et al.*, 2005).

O PCR em tempo real (qPCR) apresenta diversas vantagens quando comparado ao PCR convencional. Esse método permite a monitorização e

quantificação dos produtos da amplificação; é mais preciso, rápido e sensível, conseguindo resultados confiáveis mesmo com pouco material genético fetal e apresenta menor susceptibilidade à contaminação. Além do mais, por ser baseado em sistema óptico de detecção, dispensa qualquer manipulação ou análise pós-amplificação, o que permite que o resultado seja obtido em apenas 24 horas (LO *et al.*, 1998b; MACHADO, 2004).

A origem do DNA fetal ainda não foi totalmente elucidada. O DNA fetal livre no plasma materno pode ser resultado de ruptura de células fetais devido a danos físicos e imunológicos que pode ocorrer tanto em células placentárias como após a entrada de células fetais na circulação materna (LO *et al.*, 1998b; MOISE Jr, 2005). Ao contrário do DNA fetal isolado na porção celular do sangue materno, o qual apresenta micro-quimerismos e persiste por décadas na circulação materna, o DNA fetal livre isolado do plasma materno tem se mostrado específico da gestação atual e desaparece completamente da circulação materna alguns minutos após o parto, (LO *et al.*, 1998b; LO, 2001; DANIELS *et al.*, 2004; MOISE Jr, 2005). A inexistência de resíduo de DNA de gestações anteriores faz do DNA fetal livre no plasma uma fonte de material genético bastante atrativa para o diagnóstico pré-natal (MOISE Jr, 2008).

Como em todo teste baseado na amplificação gênica, a determinação do genótipo fetal também necessita de um controle interno para demonstrar a presença de DNA. Quando o feto é RhD-positivo, a amplificação dos exons 4, 5 e 10 do gene *RHD* por si só demonstra a presença de DNA fetal uma vez que a gestante *RHD*-negativo não apresenta o gene *RHD*. A amplificação do gene *SRY* pode ser usada como controle interno, mas apenas em gestações de fetos masculinos (RANDEN *et al.*, 2003; DANIELS *et al.*, 2004).

Vários estudos têm sido realizados a fim de se obter um controle interno da presença de DNA independente de sexo fetal. Inicialmente foi utilizada a identificação de polimorfismos gênicos por PCR em tempo real para como marcador da presença de material genético fetal na circulação materna. A ausência de um determinado polimorfismo no DNA materno e a presença do

mesmo polimorfismo no DNA plasmático confirma a presença de DNA fetal (ALIZADEH *et al.*, 2002; MOISE Jr, 2005; LO, 2006). POON *et al.* (2000) relata estudo com RNA fetal livre no plasma materno apresentando a possibilidade de se identificar a expressão gênica de tecidos fetais como controle genético da presença de ácido nucléico fetal. Outras técnicas como discriminação de um nucleotídeo por espectrofotômetro de massa e marcadores epigenéticos plasmáticos também vem sendo estudadas (LO, 2006).

1.4. PCR em Tempo Real

A reação de cadeia em polimerase em tempo real é capaz de monitorar o progresso da reação a cada ciclo, ao contrário da PCR convencional que verifica o resultado apenas ao final do processo. Existem dois sistemas utilizados na PCR em tempo real: sistema do corante SYBR Green e sistema TaqMan.

O sistema SYBR Green utiliza um corante intercalante de DNA dupla-fita. A molécula de corante livre não emite fluorescência, mas quando ligada a um DNA dupla-fita, passa a emitir fluorescência que é captada pelo equipamento. Conforme a PCR progride, mais moléculas do DNA do fragmento alvo são criadas e assim há um aumento da intensidade da fluorescência proporcional à quantidade de produto gerado pela PCR. Esse sistema pode ser usado para monitorar a amplificação de qualquer seqüência de DNA dupla-fita e não requer sonda, o que reduz os custos e as padronizações do ensaio. A principal desvantagem desse sistema é a inespecificidade do corante, ou seja, o corante liga-se a qualquer dupla-fita encontrada, inclusive a dímeros de primer e a amplificações inespecíficas.

O sistema TaqMan utiliza uma sonda fluorescente para detectar um produto específico da PCR durante os ciclos de reação. A sonda é composta por um corante *reporter* fluorescente na extremidade 5' e um corante *quencher* na extremidade 3'. Inicialmente, a proximidade do corante *quencher* inibe a fluorescência do corante *reporter* através da transferência de energia por

ressonância de fluorescência (FRET). Quando a seqüência alvo está presente, a sonda liga-se logo após um dos primers e, com a ação da Taq DNA Polimerase, enquanto o primer é estendido, a sonda é clivada. Nesta etapa, o corante *reporter* separa-se do corante *quencher* emitindo fluorescência que é captada pelo equipamento a cada ciclo produzindo um gráfico de amplificação. Por utilizar sondas de hibridização, esse sistema apresenta maior especificidade, contudo exige maior investimento financeiro.

O resultado final, independente do sistema utilizado, é apresentado em um gráfico (Figura 2). Nos ciclos iniciais da PCR, há uma pequena emissão de fluorescência, o que é conhecido como linha de base (*baseline*). A detecção de fluorescência acima da linha de base indica a amplificação da região alvo. O limiar de fluorescência (*threshold*) é ajustado na fase geométrica da amplificação, acima da linha de base (*baseline*). O ciclo no qual a fluorescência ultrapassa o *threshold* é definido como CT (ciclo limiar) (Figura 2).

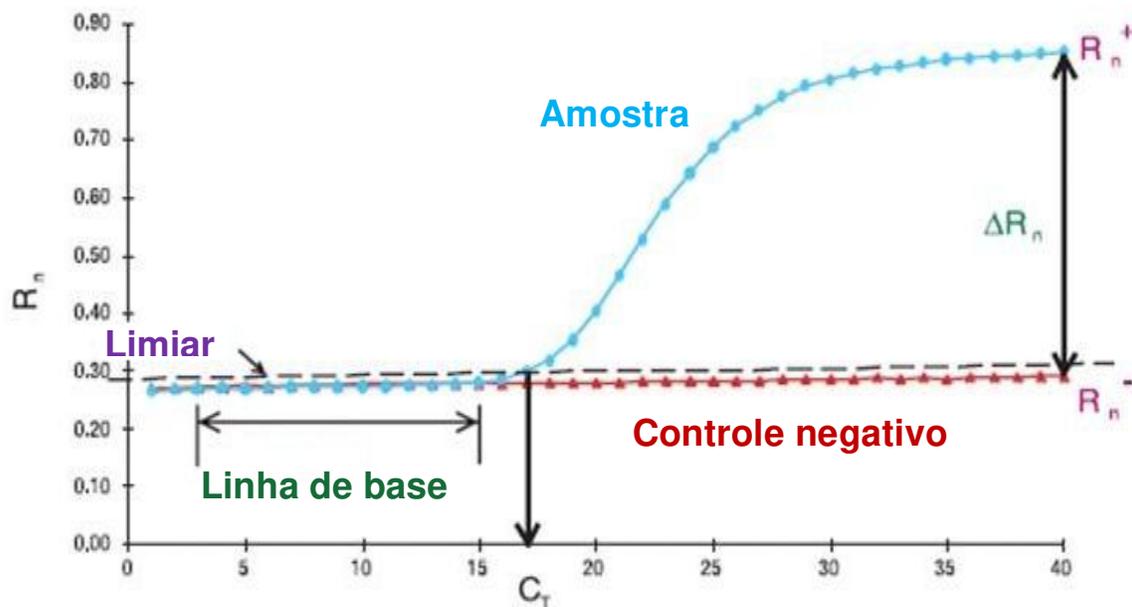


Figura 2: Gráfico explicativo do resultado final de uma amplificação por PCR em tempo real demonstrando os conceitos de linha de base, limiar (*threshold*) e CT. R_n = fluorescência captada pelo equipamento.

O PCR em tempo real pode ser facilmente empregado em um laboratório de biologia molecular e tem se mostrado altamente sensível na amplificação de baixas concentrações de DNA. Portanto, tem sido o método de escolha para amplificação do DNA fetal presente no plasma materno.

A descoberta de DNA fetal no plasma materno tem aberto novas possibilidades para a determinação de grupos sanguíneos no período pré-natal por procedimentos não-invasivos. Apesar da genotipagem *RHD* fetal pelo método de PCR em tempo real poder ser seguramente aplicada à pesquisa, ainda requer testes e padronizações em diferentes populações para ser utilizada rotineiramente de forma segura e confiável na clínica (MACHADO *et al.*, 2006)

1.5. Considerações gerais

Considerando a utilidade clínica da genotipagem *RHD* fetal de forma não invasiva na condução de gestantes RhD-negativo e na prevenção da DHPN, vários estudos de validação utilizando PCR convencional e PCR em tempo real têm sido realizados. A maioria destes estudos demonstrou que os métodos de genotipagem fetal utilizando plasma materno apresentam acurácia acima de 90%. Os melhores resultados foram obtidos com o método de PCR em tempo real. Apesar de este método ser de difícil padronização e apresentar alto custo, tem se mostrado bastante sensível na amplificação de baixas concentrações de DNA.

O resultado positivo assegura que o DNA amplificado é de origem fetal e não materna, no entanto, o resultado negativo necessita de confirmação. A utilização de controles incluindo a presença do cromossomo Y (*SRY*), β -actina ou *CCR5* pode assegurar a amplificação do DNA enquanto que a identificação de inserções e deleções de uma base de nitrogenada garante a origem do DNA amplificado. A pouca quantidade de DNA fetal livre presente no plasma materno tem se mostrado um fator limitante na inclusão satisfatória destes controles.

Resultados falso-positivos podem ocorrer em cerca de 1% dos resultados devido à presença de variantes do antígeno D principalmente em populações de origem Africana ou miscigenadas (FINNING *et al.*, 2009). Assim, protocolos envolvendo a amplificação de 2 ou 3 exons do gene *RHD* e um amplo conhecimento das variantes do gene *RHD* na população a ser analisada se faz necessário antes da introdução deste método na clínica para assegurar a correta interpretação dos resultados.

Resultados falso-negativos podem ocorrer em menos de 1% quando não se utiliza o controle adequado para assegurar que o DNA é fetal e não materno (FINNING *et al.*, 2008). Nestes casos, a implicação clínica é mais severa, pois a omissão da administração da imunoglobulina Rh na gestante RhD-negativo pode causar a aloimunização materna.

A não amplificação do DNA fetal pode ocorrer dependendo da concentração de DNA livre na circulação materna que varia entre as gestantes. Deve-se levar em consideração que as quantidades deste DNA no plasma materno são mínimas e que o período gestacional é crítico para se obter uma maior concentração de DNA. Além disto, as técnicas de extração do DNA devem ser cuidadosamente selecionadas e padronizadas.

A genotipagem *RHD* fetal por meio da análise do plasma materno é um método não invasivo para o feto e sem dúvida de grande aplicabilidade na medicina materno-fetal. No entanto, devido às dificuldades encontradas na amplificação do DNA fetal e principalmente da ausência de controles e do não conhecimento das variantes RhD na população analisada, este método tem sido introduzido na clínica com muita cautela. Acredita-se que em um futuro próximo, após resolução destas questões, a genotipagem *RHD* fetal através do plasma materno possa ser utilizada amplamente na clínica com resultados que garantam alto índice de acurácia.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

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

2.2. Objetivos Específicos

- Identificar possíveis variantes *RHD* nas amostras maternas que podem influenciar a realização da genotipagem *RHD* fetal a partir do plasma materno.

- Determinar o genótipo e a zigosidade *RHD* nas amostras paternas com a finalidade de avaliar a indicação da genotipagem *RHD* fetal.

- Comparar os resultados obtidos pela genotipagem *RHD* fetal através do plasma materno com os resultados da fenotipagem RhD nas amostras de sangue do neonato.

- Analisar a amplificação de 3 regiões do gene *RHD* (exon 4, 5 e 10) para a interpretação correta do fenótipo RhD fetal e identificar eventuais variantes *RHD*.

- Avaliar o emprego de controles internos (*SRY* e *CCR5*) que podem ser usados com segurança na genotipagem *RHD* fetal.

- Avaliar os índices de acurácia, sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo e negativo da genotipagem *RHD* fetal a partir do plasma materno em uma população do Brasil quando comparada à fenotipagem RhD fetal.

- Desenvolver um protocolo viável para a genotipagem *RHD* fetal não-invasiva a partir do DNA fetal obtido do plasma materno em uma população do Brasil.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Metodologia da Pesquisa

3.1.1. Desenho do Estudo

Este ensaio teve por objetivo validar uma técnica diagnóstica e portanto trata-se de um estudo prospectivo de validação de teste diagnóstico.

A avaliação da qualidade deste estudo baseou-se na comparação independente e cega com o teste padrão-ouro de referência - fenotipagem RhD.

3.1.2. Parâmetros de validação do teste diagnóstico

Vários parâmetros devem ser avaliados para validar um teste diagnóstico. A validade intrínseca que é o desempenho do teste quando comparado a um teste de referência, pode ser avaliado por parâmetros como sensibilidade, especificidade e acurácia. Esses parâmetros são característicos do teste e não da população em que está sendo estudada (FLETCHER & FLETCHER, 2006; ROSA *et al.*, 2008).

Para obter os parâmetros de validação de um teste utiliza-se uma tabela de dupla entrada a partir dos resultados obtidos neste estudo, relacionando o teste que está sendo padronizado com um teste de referência (padrão-ouro).

		Fenotipagem RhD Neonatal Teste de Referência	
		Positivo	Negativo
Genotipagem RHD fetal no plasma materno Teste em validação	Positivo	Verdadeiro positivo	Falso positivo
	Negativo	Falso negativo	Verdadeiro negativo

A sensibilidade refere-se à percentagem de resultados positivos pela genotipagem em uma população de indivíduos fenotipados como RhD+, ou seja, é a proporção de acerto de um resultado positivo. Um teste molecular altamente sensível amplifica o maior número possível de amostras que tenham determinado fenótipo positivo (FLETCHER & FLETCHER, 2006; ROSA *et al.*, 2008).

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{Verdadeiro Positivo}}{\text{Verdadeiro Positivo} + \text{Falso Negativo}}$$

A especificidade refere-se à percentagem de resultados negativo pela genotipagem em uma população de indivíduos fenotipados como RhD-, ou seja, é a proporção de acerto de um resultado negativo. Um teste molecular altamente específico detecta como negativo o maior número possível de amostras que tenham fenótipo negativo (FLETCHER & FLETCHER, 2006; ROSA *et al.*, 2008).

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{Verdadeiro Negativo}}{\text{Verdadeiro Negativo} + \text{Falso Positivo}}$$

A acurácia do teste refere-se ao grau em que um valor resultante de uma mensuração representa um resultado verdadeiro. A acurácia é obtida através da relação entre os verdadeiros resultados positivos e negativos sobre toda população estudada. Este parâmetro determina a capacidade do teste em fornecer resultados muito próximos ao verdadeiro (FLETCHER & FLETCHER, 2006; ROSA *et al.*, 2008).

$$\text{Acurácia} = \frac{\text{Verdadeiro Positivo} + \text{Verdadeiro Negativo}}{\text{Total}}$$

O valor preditivo positivo (VPP) refere-se à probabilidade do resultado positivo da genotipagem *RHD* fetal ser correto enquanto que o valor preditivo negativo (VPN) refere-se à probabilidade do resultado negativo da genotipagem *RHD* fetal ser correto. Quanto mais sensível for o teste, maior será o valor preditivo negativo. De outro modo, quanto mais específico for o teste, maior será o valor preditivo positivo (FLETCHER & FLETCHER, 2006; ROSA *et al.*, 2008).

$$\text{VPP} = \frac{\text{Verdadeiro Positivo}}{\text{Verdadeiro Positivo} + \text{Falso Positivo}}$$

$$\text{VPN} = \frac{\text{Verdadeiro Negativo}}{\text{Verdadeiro Negativo} + \text{Falso Negativo}}$$

Os objetivos da medicina laboratorial são melhorar cada vez mais a avaliação acurácia e precisão dos testes, garantindo uma interpretação correta, a fim de facilitar a análise de dados (MIURA & SARAIVA, 1998).

3.1.3. Tamanho Amostral

O feto de uma gestante RhD-negativo tem uma probabilidade de 50% de ser RhD-positivo se o progenitor paterno for RhD-positivo heterozigoto, 100% se o progenitor paterno for RhD-positivo homozigoto e 0% se o progenitor for RhD negativo. Dados na literatura relatam que 15% da população Caucasiana é RhD-negativo e 55% da população RhD positivo é heterozigota para a presença do gene *RHD*. Assim, estima-se que, em gestantes RhD-negativo, cerca de 62% dos fetos serão RhD-positivo.

Portanto, foi proposto arrolar no estudo, de 80 a 120 gestantes RhD-negativo atendidas no ambulatório de pré-natal especializado e no pré-natal de alto-risco do CAISM no período entre 2008 e 2009.

3.1.4. Definição de Variáveis

I. Idade gestacional: Tempo de gravidez em número de semanas completas, estimado pela ultra-sonografia, através do comprimento cabeça-nádega (CCN) do feto. Nos casos em que a idade gestacional pela DUM (data do primeiro dia da última menstruação) diferir em 7 dias ou mais da idade gestacional calculada pela ultra-sonografia, esta última será considerada como datação, para os fins deste estudo.

II. Genotipagem *RHD* fetal no plasma materno por PCR em tempo real: Classificação do tipo sanguíneo fetal no Sistema *Rhesus* quanto à presença do gene *RHD*, utilizando o DNA de origem fetal extraído do plasma materno.

Categorias: *RHD*-positivo / *RHD*-negativo

Método testado.

III. Fenotipagem RhD neonatal no sangue de cordão ou sangue periférico: Classificação da tipagem sanguínea neonatal no Sistema *Rhesus* quanto à presença do antígeno D, pelas técnicas convencionais de hemaglutinação, utilizando o sangue de cordão umbilical colhido no pós parto imediato ou o sangue periférico dos neonatos.

Categorias: RhD-positivo / RhD-negativo

Padrão de validade (padrão-ouro)

3.1.5. Aprovação Ética

O estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Pesquisa do Departamento de Tocoginecologia do CAISM (nº 092/2007) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa do Conselho Nacional de Saúde (nº 093/2008, CAAE 0067.0.146.000-08).

3.2. Materiais

3.2.1. Tubos de coleta de sangue

Os tubos utilizados para a coleta de sangue foram: um tubo convencional de EDTA K3EDTA, Vacuette, obtidos da empresa Greiner Bio-one Brasil (Americana, SP, BR) para retirada de leucócitos e obtenção de DNA materno e paterno e um tubo PPT (plasm preparation tube) com K2EDTA 9.0mg, obtido da empresa Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ, US) para preparação de plasma e obtenção de DNA fetal.

3.2.2. Kits de extração de DNA

Para a extração do DNA materno e paterno do sangue periférico e do DNA fetal do plasma materno foi utilizado o kit comercial QIAamp Blood Mini Kit da Qiagen® (Chattlesworth, CA, US). O Kit incluía Buffer AL, Buffer AW1, Buffer AW2, QIAamp colunas, tubos de lise e proteinase K.

3.2.3. Água livre de nuclease

A água livre de nuclease utilizada neste trabalho foi adquirida da empresa Applied Biosystems® (Foster City, CA, US). Este reagente foi utilizado na etapa final da extração de DNA, na reconstituição dos primers e nas reações de PCR convencional e PCR em tempo real.

3.2.4. Etanol

O etanol utilizado no protocolo de extração foi obtido da empresa Allkimia (Campinas, SP, BR)

3.2.5. Primers

Os primers utilizados para os protocolos de PCR convencional e PCR em tempo real foram obtidos da empresa Invitrogen® (Carlsbad, CA, US) e estão descritos nas Tabelas 1, 2, 3, 4 e 5.

3.2.6. Sondas

As sondas utilizadas para os protocolos de PCR em tempo real foram obtidas da empresa Applied Biosystems® (Foster City, CA, US) e estão descritos na Tabela 5.

3.2.7. Platinum SYBR Green qPCR SuperMix- UDG with ROX

O cocktail denominado SYBR Green Supermix utilizado nas reações de PCR em tempo real para a padronização por SYBR Green foi obtido da empresa Invitrogen® (Carlsbad, CA, US). O Supermix para 100 reações (2x 1,25mL) na concentração de 2X é composto por Platinum Taq DNA Polimerase, corante SYBR Green I, Tris-HCl, KCl, 6nM de MgCl₂, 400nM de dGTP, 400nM de dATP, 400nM de dCTP, 800nM de dUTP, uracil DNA glicosilase (UDG), 1uM de corante de referência ROX e estabilizantes.

3.2.8. TaqMan Universal PCR Master Mix 2X

O cocktail denominado TaqMan Mastermix utilizado nas reações de PCR em tempo real foi obtido da empresa Applied Biosystems® (Foster City, CA, US). Esse mastermix é composto por AmpliTaq Gold DNA Polymerase, AmpErase UNG, dNTPs com dUTP, referência passiva dentre outros componentes.

3.2.9. Taq DNA Polimerase

As enzimas Taq DNA polimerase, utilizadas nas reações de PCR convencional foram obtidas da Invitrogen® (Carlsbad, CA, US). O Kit contendo 5 unidades/ μ L desta enzima, incluía 1 mL de tampão 10X (200 mM Tris-HCl (pH8.4) e 500 mM de KCl) e 1 mL de $MgCl_2$ 50mM.

3.2.10. LongAmp Taq DNA Polimerase

A enzima LongAmp Taq DNA polimerase utilizada nas reações de PCR para zigosidade *RHD* foi obtida da empresa New England Biolab® (Beverly, MA, US). O Kit contendo 5 unidades/ μ L desta enzima, incluía 1mL de tampão 5X (100mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 7.4), 0,1mM de dithiothreitol, 0,5% de Tween 20, 0,5% NP-40 e 50% de glicerol).

3.2.11. dNTP 10mM

Os nucleotídeos (dNTPs) foram obtidos da empresa Fermentas Life Science® (Burlington, ON, CA). Para as reações de amplificação foram utilizados dNTPs na concentração de 10 mM (diluição de 20 μ L de cada nucleotídeo em 120 μ L de água deionizada).

3.2.12. Enzimas de restrição

A enzima de restrição *Pst* I foi adquirida da empresa Fermentas Life Science® (Burlington, ON, CA) e foi utilizada para digestão do produto de PCR com a finalidade de determinar a zigosidade do gene *RHD*. O kit contendo 3.000U (10U/ μ L) desta enzima incluía o tampão Buffer O+ (50mM de Tris-HCl (pH 7.5), 10mM de $MgCl_2$, 100mM de NaCl e 0,1 mg/mL de BSA) utilizado na reação de digestão enzimática.

3.2.13. Dimetilsulfóxido (DMSO)

O composto DMSO utilizado na reação de PCR de zigozidade *RHD* foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, US)

3.2.14. Marcadores moleculares

Marcadores de 50pb (New England Biolab®, Beverly, MA, US), 100 pb e 1 Kb (Fermentas Life Science®, Burlington, ON, CA), foram utilizados na análise do tamanho dos fragmentos de DNA.

3.2.15. Tampão Tris-EDTA-Borato (TEB) 10x

Este tampão foi preparado, dissolvendo-se 108g de Tris (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, US), 55g de ácido bórico (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, US) e 40mL de EDTA 0,5M pH 8.0 (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, US), em 1000mL de água deionizada e destilada (ddH₂O).

3.2.16. Tampão Tris-EDTA-Borato (TEB) 1x

O tampão TEB 1X foi preparado diluindo-se 100 mL de TEB 10X em 900 mL de água deionizada e destilada (ddH₂O).

3.2.17. Gel de agarose (1,5% e 4%)

A solução de agarose foi preparada dissolvendo-se 1,5g (para solução a 1,5%) ou 4g (para solução a 4%) de agarose (Invitrogen®, Carlsbad, CA, US) em 100 mL de TEB 1X. Esta solução era aquecida em forno e microondas, durante 1 minuto e, após resfriamento, era adicionado a ela 50 µg de brometo de etídio (Invitrogen®, Carlsbad, CA, US).

3.2.18. Gel de poliacrilamida 12%

A solução de poliacrilamida foi preparada misturando-se, em, 23,3 mL de acrilamida 40% (Gibco BRL ®, Gaithersburg, MD, US), 8,8 mL de TEB 10X, 55 mL de ddH₂O, 363 µL de persulfato de amônio 10% (Gibco BRL ®, Gaithersburg, MD, US) e 66 µL de TEMED (Gibco BRL ®, Gaithersburg, MD, US). Esta solução era colocada em uma placa de vidro, previamente preparada, até que ocorresse a sua polimerização.

3.3. Métodos

3.3.1. Seleção de pacientes e coleta de dados

Gestantes maiores de 18 anos com gestação única, fenotipadas como RhD-negativo, residentes no Brasil e atendidas no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) – UNICAMP no período de setembro de 2008 a outubro de 2009 foram contatadas, durante o retorno da consulta do pré-natal em dia e hora pré determinados. Neste primeiro contato com a pesquisadora, foram fornecidas à paciente todas as informações sobre a pesquisa, as eventuais dúvidas sobre o assunto foram respondidas. Para as pacientes que concordaram em participar voluntariamente da pesquisa, o termo de consentimento livre e esclarecido foi entregue para ciência e autorização. Neste momento, foi preenchido um formulário com dados pessoais e clínicos da paciente, foram coletadas as primeiras amostras de sangue periférico e foi obtida a datação ultrassonográfica da gestação. Na eventual presença do genitor paterno também foi solicitada a participação do mesmo através da doação uma amostra de sangue periférico.

3.3.2. Acompanhamento

A pesquisa não incluiu o acompanhamento clínico das gestantes, porém estas foram seguidas por contatos pessoais ou telefônicos, a fim de se detectar possíveis interrupções e desfechos inesperados das gestações que poderiam caracterizar critérios e causas de descontinuação no estudo.

3.3.3. Pesquisa de anticorpos irregulares no sangue materno

A pesquisa de anticorpos irregulares foi realizada durante os exames rotineiros das gestantes atendidas no ambulatório do CAISM. Os resultados foram obtidos diretamente dos prontuários das gestantes ou do arquivo de resultados do Laboratório de Imunohematologia do Hemocentro.

3.3.4. Crítérios de Inclusão, Exclusão e Descontinuação de pacientes

Crítérios de Inclusão

- Pacientes com fenótipo RhD-negativo;
- Idade igual ou superior a 18 anos;
- Pacientes que estão realizando pré-natal no CAISM;
- Pacientes de gestações de feto único a partir da 4ª semana gestacional;
- Pacientes que concordam com os termos do consentimento livre e esclarecido.

Crítérios de exclusão:

- Gestações múltiplas;
- Pacientes com menos de 4 semanas completas de idade gestacional;
- Pacientes que não concordam com os termos do consentimento livre e esclarecido e se negarem a participar da pesquisa.

Critérios de Descontinuação

- Pacientes que, a qualquer momento passem a discordar do termo de consentimento livre e esclarecido;
- Gravidez terminada em abortamento;
- Impossibilidade de comprovação da fenotipagem RhD neonatal.

3.3.5. Obtenção das amostras

As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa com agulhas e seringas estéreis e descartáveis. Aproximadamente 10 mL de sangue foram obtidos em 2 tubos: um tubo convencional de EDTA para retirada de leucócitos e obtenção de DNA materno e um tubo PPT com K2EDTA 9.0mg para preparação de plasma e obtenção de DNA fetal. Os tubos PPT são específicos para pesquisas moleculares em plasma, pois possuem EDTA na forma sólida, não havendo assim, diluição da amostra.

3.3.6. Processamento das amostras

Os tubos foram devidamente identificados com nome da paciente, data e horário da coleta e encaminhados ao laboratório. Com, no máximo, 2 horas após a coleta, as amostras foram centrifugadas, a 4.000 rpm por 10 minutos a fim de separar o plasma e os leucócitos. A camada leucocitária foi retirada para ser utilizada na extração de DNA materno. O plasma foi então centrifugado novamente a 13.000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante obtido foi armazenado a -20°C em alíquotas de 1mL, para extração de DNA fetal próximo ao momento da utilização.

Toda a análise laboratorial das amostras foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Hemoterapia do Hemocentro - UNICAMP, onde os resultados estão armazenados em arquivo próprio e disponível para consulta.

3.3.7. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando o kit comercial QIAamp Blood Mini Kit da Qiagen. Neste método, a amostra é submetida a uma lise enzimática com proteinase K e, após tratamento com um agente caotrópico, o hidrocloreto de guanidina, este lisado é colocado em uma coluna de sílica, que possui afinidade por ácidos nucleicos. Após sucessivas lavagens, o DNA aderido à sílica é eluído com tampão apropriado fornecido pelo próprio Kit de extração.

A extração do DNA materno e paterno foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante (Blood and body fluid spin protocol) utilizando, na etapa inicial, 400 µL da camada leucocitária obtida do sangue total. A eluição final de DNA foi realizada com 100 µL tampão AE fornecido pelo kit de extração.

A extração de DNA fetal foi realizada de acordo com o protocolo descrito por FINNING *et al.* (2009) utilizando-se uma alíquota de 800µL de plasma por paciente previamente centrifugada e congelada. As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e centrifugadas novamente a 13.000 rpm por 10 minutos a fim de separar o crioprecipitado. O sobrenadante foi colocado em um novo microtubo. Foi realizada a lise enzimática com 60µL de protease K. O produto plasma/protease foi misturado por vortex e dividido em 2 microtubos (430µL em cada). A cada microtubo foi adicionado 400µL de buffer AL e misturado por vortex. Em seguida, o produto foi incubado em banho-seco a 56°C por 15 minutos. Foi adicionado 400µL de etanol, misturado por vortex e deixado em repouso à temperatura ambiente por 5 minutos. Seiscentos (600) µL do lisado foram colocados na coluna de sílica fornecida no kit e a mesma foi centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto. Esse procedimento foi repetido 4 vezes até que todo o volume de lisado fosse filtrado pela coluna de sílica. Em seguida, foi adicionado 500µL de buffer AW1 com subsequente centrifugação a 13.000 rpm por 1 minuto. A coluna foi colocada em um novo tubo. Foi adicionado 500µL de buffer AW2 à coluna com nova centrifugação sob as mesmas condições. A coluna foi colocada em um outro tubo que foi centrifugado a 13.000 rpm por 3 minutos para retirar todo o resíduo de buffer AW2. Na etapa final foi adicionado 55µL de água livre de

nuclease à coluna para eluir o DNA. A coluna foi mantida a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugada a 13.000 rpm por 1 minuto. O DNA foi mantido a 4°C até a realização do PCR em tempo real.

Após extração, a quantidade do DNA foi avaliada através de leitura óptica da absorbância (DO 260/280nm) e da concentração em ng/μL através de um equipamento de espectrofotometria (NanoDrop ND – 1000 Full- spectrum UV/Vis Spectrophotometer, Wilmington, DE, US).

3.3.8. Genotipagem *RHD* materna e paterna

A genotipagem *RHD* materna e paterna foi realizada com a finalidade de identificar possíveis variantes do gene *RHD* como D fraco e D parcial, o pseudogene *RHD* (*RHDΨ*) e o gene *RHD* híbrido (*RHD-CE-D^s*).

3.3.8.1. Genotipagem *RHD* e *RHDΨ*

A genotipagem *RHD* e a determinação do pseudogene *RHD* foram realizadas utilizando-se técnicas de PCR alelo-específico que permitem a amplificação do gene *RHD* e a detecção da duplicação de 37 pb do gene *RHD* conhecida como pseudogene *RHD* ou *RHDΨ* (SINGLETON *et al.*, 2000). Os primers e concentrações utilizadas encontram-se na tabela 1.

A reação de PCR utilizou 200 ng de DNA, 50 pmol de cada primer, 2 nmol de cada dNTP, 1.0 U de Taq DNA polimerase e tampão em um volume final de 50 μL. A análise dos produtos de PCR obtido foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Figuras 2A e 2B).

O genótipo *RHD* positivo é indicado pela amplificação do gene *RHD* (Intron 4 e Exon 7) e do controle interno (*HGH*). O genótipo *RHD* negativo é indicado pela ausência do gene *RHD* e amplificação apenas do *HGH* (Figura 3A).

A presença do pseudogene é identificada pela amplificação de um fragmento de 250pb do exon 4 de *RHD* (Figura 3B).

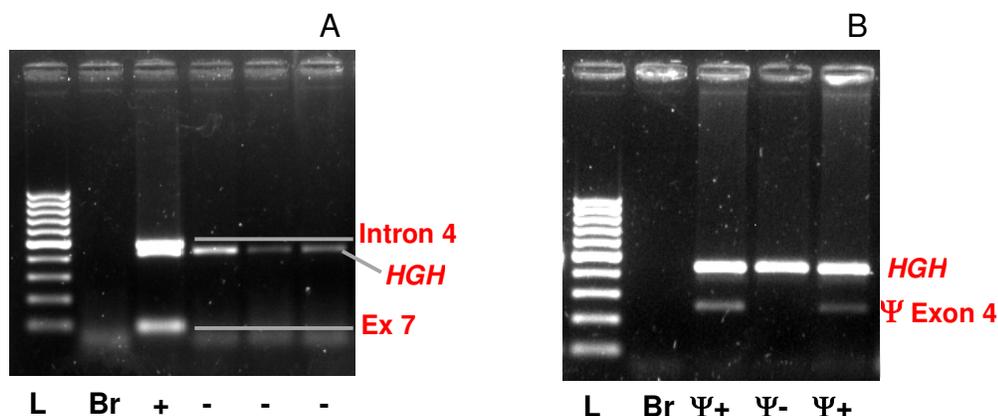


Figura 3: Imagem do gel de agarose corado com brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. L: marcador de peso molecular (Ladder 100pb), Br(branco): tubo-controle negativo da reação. A: Reação de PCR do gene *RHD* Intron 4, *HGH* e Exon 7 demonstrando uma reação positiva (+) e 3 negativas (-). B: Reação de PCR do pseudogene *RHD* demonstrando duas amostras positivas e 1 negativa.

3.3.8.2. Identificação de variantes *RHD* fraco, *RHD* parcial e do gene *RHD-CE-D^s*

A expressão do antígeno RhD pode estar alterada na presença de variantes *RHD* fraco e *RHD* parcial ou ausente na presença do gene *RHD-CE-D^s* e portanto é importante identificar estas variantes nas amostras maternas.

A caracterização molecular dos antígenos RhD fraco foi realizada utilizando-se uma técnica de PCR alelo-específico (MÜLLER *et al.*, 2001) com o objetivo de identificar os cinco tipos do antígeno RhD fraco que ocorrem com mais frequência. A seqüência de primers utilizados encontram-se descrita na tabela 2. A análise final dos produtos de PCR obtidos foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Figura 4).

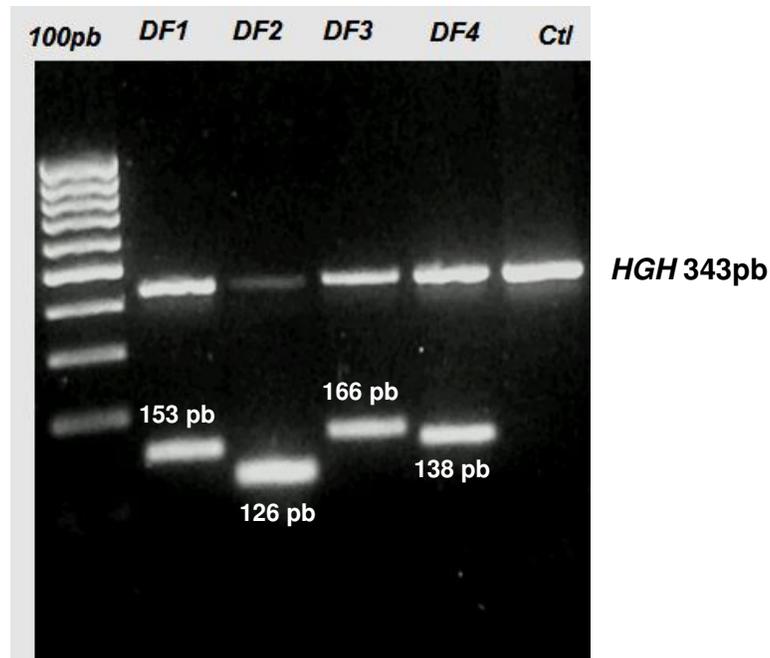


Figura 4: Reação de PCR-ASP demonstrando amplificação para diversos tipos de *RHD* fraco.

A identificação das variantes *RHD* parcial que ocorrem pela presença de genes híbridos e do gene *RHD-CE-D^s* foi realizada através da técnica de PCR multiplex que amplifica 6 exons específicos do gene *RHD* (tabela 3). As variantes híbridas são identificadas pela ausência de uma dessas regiões (MAASKANT-van WIJK *et al.*, 1998) e os alelos *RHD* parciais que ocorrem pela presença de genes híbridos são caracterizados de acordo com os exons amplificados. A figura 5 ilustra a presença de um gene *RHD* normal em que todos os exons do gene *RHD* estão amplificados e a presença de alelos *RHD* parcial categoria Va que possuem o exon 5 do gene *RHCE*.

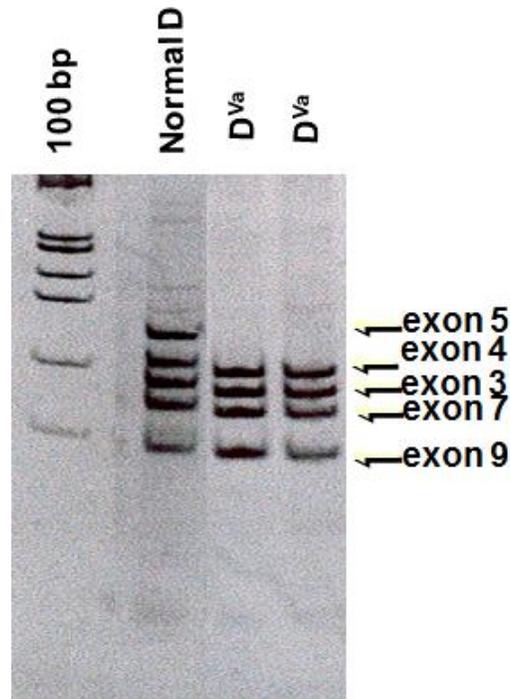


Figura 5: Genótipo *RHD* normal (linha 2) e *RHD* parcial categoria Va (linhas 3 e 4) que podem ser identificados pela técnica de PCR multiplex.

3.3.9. Zigozidade *RHD* paterna

Para determinar a zigozidade *RHD*, foi realizado um PCR-RFLP em uma reação de alta fidelidade e primers rez7 (não-específico, identifica a região 5' da Rhesus box) e rnb31 (específico para a região 3' downstream da Rhesus box) descrito por WAGNER & FLEGEL (2000).

As seqüências dos primers utilizados para a determinação da zigozidade *RHD* estão descritas na Tabela 4. Controles de DNA com genótipos *RHD* homozigoto, heterozigoto e *RHD* negativo conhecidos foram incluídos.

A reação de PCR foi realizada com 100-250 ng de DNA, 0,25 uM de cada primer, 300 uM de cada dNTP, 1,5µL de DMSO, 2,5 U de LongAmp DNA polimerase, tampão 5X e água livre de nuclease em um volume final de 25µL.

utilizando-se o termociclador GeneAmp PCR systems 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, US).

O produto do PCR foi digerido por 12 horas com a enzima de restrição *Pst* I a 37°C e, os fragmentos analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

O genótipo *RHD* negativo apresenta 3 sítios de restrição e é indicado pela presença dos fragmentos de 1.888pb, 567pb, 397pb e 179pb. O genótipo *RHD+/RHD+* homocigoto perde um sítio de restrição e apresenta apenas 3 fragmentos (1.888pb, 774pb e 397pb). O genótipo *RHD+/RHD-* heterocigoto apresenta os fragmentos de 1.888pb, 774pb, 567pb, 397pb e 179pb (Figura 6)

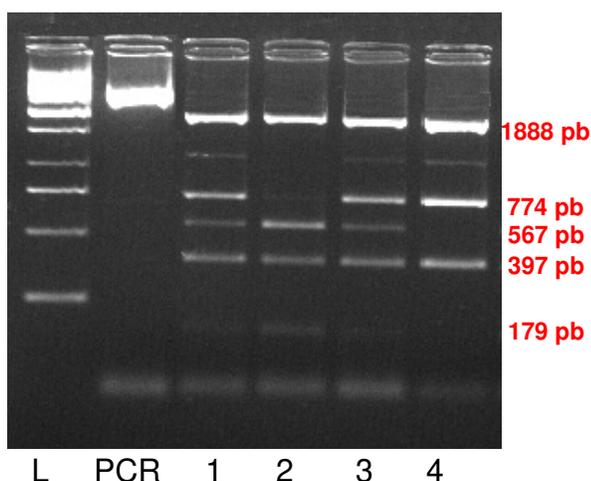


Figura 6: Imagem do gel de agarose corado com brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. L: marcador de peso molecular (Ladder 1kb), PCR: produto de PCR não digerido, 1 e 3: Amostra *RHD+/RHD-* heterocigota; 2: Amostra *RHD-*; 4: Amostra *RHD+/RHD+* homocigota.

3.3.10. PCR em tempo real por TaqMan

O PCR em tempo real por TaqMan é a técnica recomendada para a realização da genotipagem *RHD* em amostras de DNA fetal. Os primers e sondas utilizados foram previamente descritos por FINNING *et al.*, 2009 (Tabela 5).

Neste estudo, optamos pela amplificação dos exons 4, 5, e 10 do gene *RHD*, do gene *SRY* e do gene *CCR5*. Sondas TaqMan para o gene *RHD* (exons 4 e 5) e para o gene *CCR5* foram marcadas na região 5'-terminal com o corante 6-FAM (carboxyfluoresceína). Sondas para os genes *RHD* (exon 10) e *SRY* foram marcadas na região 5'-terminal com o corante VIC®. Todas as sondas TaqMan foram marcadas na região 3'-terminal com o corante *quencher* TAMRA (6-carboxy-tetramethylrhodamine). O equipamento utilizado para realização das reações de PCR em tempo real por TaqMan foi o RotorGene 6.000 5-plex (Corbett Research Life Science, QIAGEN, Chattersworth, CA, US).

3.3.10.1. Padronização e otimização das reações por qPCR

A padronização do PCR em tempo real por TaqMan incluiu 4 etapas: teste de amplificação de sondas e primers, concentração de primers, concentração de sonda e curva de eficiência.

I. Teste de amplificação dos primers e sonda em qPCR

Com a finalidade de testar a sonda e validar o ensaio, foi realizada uma amplificação inicial de cada região separadamente por PCR em tempo real (*RHD* exons 4, 5, 10, *SRY* e *CCR5*). A reação foi composta por uma concentração padrão de primer e sonda (150nM e 200nM respectivamente), TaqMan Mastermix Universal 2X e 75ng de DNA em um volume final de 15µL.

II. Padronização de concentração de primers em qPCR por SYBR Green.

A curva de concentração de primer tem o objetivo de determinar a menor concentração de primer capaz de apresentar amplificação com o menor CT. Foi realizada uma curva de concentração de primer por PCR em tempo real com SYBR Green, ou seja, sem utilizar a sonda, a fim de avaliar apenas a

variação de concentração de primer. A reação foi composta por Platinum SYBR Green qPCR SuperMix 2X, primer e 75ng de DNA, em um volume final de 15 μ L. As concentrações de primer testadas foram: 70nM, 150nM, 300nM e 600nM, utilizando sempre o primer forward e reverse nas mesmas concentrações.

III. Padronização de concentração de sondas em qPCR por TaqMan.

Através da curva de concentração de sonda é possível determinar a menor concentração de sonda capaz de apresentar amplificação com o menor CT. Foi realizada uma curva de concentração de sonda por PCR em tempo real com TaqMan. A reação foi composta por TaqMan Universal Mastermix 2X, primers na concentração estabelecida na etapa anterior (curva de concentração de primer) e 75ng de DNA, em um volume final de 15 μ L. As concentrações de sonda testadas foram: 50nM, 100nM, 150nM e 200nM.

IV. Curva de eficiência em singleplex e multiplex

Após estabelecer as concentrações ideais de primers e sondas, realizou-se a curva de eficiência para cada região gênica separadamente. As concentrações de DNA utilizadas foram obtidas através da diluição seriada 1:2 com concentração inicial de 160ng/ μ L. Assim as concentrações utilizadas foram: 160; 80; 40; 20; 10; 5 e 2,5 ng/ μ L.

Com resultados satisfatórios nesta etapa, realizou-se a curva de eficiência em multiplex: exon 4 associado com exon 10 e exon 5 associado com *SRY*, com as mesmas concentrações utilizadas na etapa anterior.

3.3.10.2. Genotipagem *RHD*

Após a conclusão da etapa de padronização, iniciou-se a realização da genotipagem *RHD* fetal por PCR em tempo real com TaqMan com as amostras de DNA fetal.

A reação foi composta por TaqMan Universal Mastermix 2x, primers e sondas, 6 ng de DNA extraído a partir do plasma materno e água livre de nuclease em um volume final de 15µL. As concentrações de primers e sondas foram estabelecidas através dos testes de padronização descritos anteriormente. As amostras foram analisadas em triplicatas para o gene *RHD* (Exon 4, 5 e 10) e *SRY* e em duplicata para *CCR5*.

Em cada corrida de reação para *RHD*, *SRY* e *CCR5* foram incluídos controles positivos, negativos e um tubo-controle negativo no qual é adicionado todos os reagentes exceto a amostra de DNA denominado NTC (no template control). Os controles positivos e negativos foram obtidos a partir de amostras com genótipos conhecidos. Os controles positivos (*RHD* positivo e masculino) foram utilizados na concentração de 20ng/µL. Os controles negativos (*RHD* negativo e feminino) e pseudogene positivo (*RHD* pseudogene e feminino) foram utilizados na concentração de 2ng/µL em duplicata.

O ciclo térmico foi iniciado por período de incubação de 2 minutos a 50°C para a ação da enzima uracil N-glicosilase, que destrói eventuais amplicons contaminantes. Em seguida, foi realizada uma etapa de desnaturação por 10 minutos a 95°C e 50 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e reanelamento/extensão por 1 minuto a 60°C. Os resultados foram analisados com o uso do software Rotor-Gene 6.000 software 1.7.87 (Corbett Research Life Science, QIAGEN, Chattlesworth, CA, US).

A fim de evitar a contaminação da reação, foram adotadas algumas medidas preventivas. No preparo das reações, utilizaram-se ponteiras com filtro e pipetas exclusivas para reações de pré-PCR. As reações foram pipetadas em fluxo laminar previamente limpo com solução descontaminante que degrada DNA e RNA.

3.3.10.3. Interpretação dos resultados

Através do Rotor-Gene 6000 Software 1.7 foi possível analisar as curvas de amplificação para cada ensaio. O valor limiar de fluorescência (*threshold*) utilizado neste estudo para FAM e VIC® nos ensaios *RHD* Exon4/Exon10 e *RHD* Exon5/*SRY* foi de 0,03. Para o ensaio do gene *CCR5*, utilizou-se o valor limiar de fluorescência estabelecido através da curva de eficiência. A linha de base (*baseline*) foi estabelecido automaticamente pelo software.

Os gráficos de amplificação para cada exon do gene *RHD*, *SRY* e *CCR5* foram observados para cada amostra. Consideramos como resultados positivos, amostras com CT < 42.

O feto foi classificado como *RHD*-positivo quando pelo menos 1/3 replicatas para um dos 3 exons foi positiva com uma amplificação adicional de pelo menos 2/3 para os outros exons. Entretanto, quando houve apenas 1/3 amplificação para cada um dos exons o resultado *RHD* foi considerado indeterminado e a reação de qPCR foi repetida. Se uma amostra apresentasse replicatas positivas apenas para o exon 10, o feto poderia ser portador de uma variante *RHD* como o *RHD* pseudogene ou o gene híbrido *RHD-CE(3-8)-D^S* e o fenótipo deduzido era considerado RhD-negativo (Quadro 1).

O feto foi considerado *RHD*-negativo se nenhuma replicata ou 1/3 replicata para apenas um exon fosse positiva (Quadro 1). Nesta situação, o resultado da amplificação do gene *SRY* foi utilizado para confirmar a presença de DNA fetal em fetos masculinos.

O feto foi considerado masculino quando pelo menos 2/3 replicatas para o gene *SRY* eram positivas, e feminino se nenhuma replicata apresentasse amplificação. Para os casos onde apenas 1/3 replicata foi positiva, o resultado foi considerado indeterminado e a reação de qPCR foi repetida (Quadro 2). Quando a repetição apresentou 1/3 replicata positiva, ou seja, 2/6 replicatas positivas no total, o feto foi considerado masculino.

Quadro 1: Padrão de interpretação da genotipagem *RHD* fetal através de qPCR em amostras analisadas em triplicatas.

Exon 4	Exon 5	Exon 10	Conclusão
2 ou 3	2 ou 3	2 ou 3	<i>RHD+</i>
2 ou 3	2 ou 3	1	<i>RHD+</i>
2 ou 3	1	2 ou 3	<i>RHD+</i>
1	2 ou 3	2 ou 3	<i>RHD+</i>
0	0	2 ou 3	<i>RHD variante</i>
0	0	0	<i>RHD-</i>
0	0	1	<i>RHD-</i>
0	1	0	<i>RHD-</i>
1	0	0	<i>RHD-</i>
2 ou 3	2 ou 3	0	Inconclusivo
2 ou 3	0	2 ou 3	Inconclusivo
2 ou 3	0	0	Inconclusivo
0	2 ou 3	2 ou 3	Inconclusivo
0	2 ou 3	0	Inconclusivo
1	1	1	Inconclusivo

Quadro 2: Padrão de interpretação da sexagem fetal através de qPCR em amostras analisadas em triplicatas.

SRY	Conclusão
0	Feminino
1	Inconclusivo
2 ou 3	Masculino

3.3.10.4. Validação dos controles e controle de qualidade

Os controles negativos e NTC não deveriam apresentar CT < 42, pois este resultado pode indicar uma contaminação da reação de qPCR. Os controles positivos deveriam apresentar CT < 42 em todas as replicatas.

O *slope* (inclinação) da curva padrão de eficiência deveria estar entre -3,30 e -3,40 para uma reação de amplificação com eficiência próxima a 100%, ou seja, duplicação a cada ciclo.

3.3.11. Fenotipagem RhD neonatal

Uma vez que a tipagem sanguínea ABO e RhD neonatal é realizada rotineiramente pelas maternidades conveniadas do Sistema Único de Saúde (SUS) em Campinas, esse resultado foi obtido do “Cartão de Acompanhamento da Criança” ou do arquivo de resultados do Laboratório de Imunohematologia do Hemocentro, após à época da data provável do parto (DPP), evitando procedimentos específicos deste estudo.

3.3.12. Análise Estatística

Inicialmente foi realizada uma análise descritiva univariada. Em seguida, foram feitos os cálculos de sensibilidade, especificidade, e valor preditivo positivo e negativo, da genotipagem *RHD* fetal no plasma materno em comparação com a fenotipagem neonatal.

Tabela 1: Seqüência e concentração de primers utilizados na genotipagem *RHD* e tamanho em pares de base (pb) dos fragmentos obtidos por PCR convencional.

Primer	Seqüência (5'-3')	Fragmento	Concentração
Exon 7 for	AGCTCCATCATGGGCTACAA	95pb	0,45uM
Exon 7 ver	ATTGCCGGCTCCGACGGTATC		
Intron 3/for 1	GGGTTGGGCTGGGTAAGCTCT	498 ou 535pb	0,15uM
Intron 4 rev	GAACCTGCTCTGTGAAGTGCT		
Intron 3/for 2	AACCTGGGAGGCAAATGTT	250pb	0,15uM
Exon 4 insert rev	AATAAAACCCAGTAAGTTCATGTGG		
<i>HGH 5967</i>	CCACTCACGGATTTCTGTTGTGTTTC	434 pb	0,25uM
<i>HGH 5580</i>	TGCCTTCCAACCATTCCCTTA		

Tabela 2: Seqüência e concentração de primers utilizados na pesquisa de variantes *RHD* fraco (DF1 a DF5) e *RHD* parcial (HMi) e tamanho em pares de base (pb) dos fragmentos obtidos por PCR convencional alelo-específico.

Primer	Seqüência (5'-3')	Fragmento	Concentração
DF1S	ACACGCTATTTCTTTGCAGACTTATGG	153 pb	0,25 uM
DF1R	GGTACTTGGCTCCCCCGAC		
DF2S	CTCCAAATCTTTTAACATTAAATTATGCATTTAAACAGC	126 pb	0,70 uM
DF2R	GTGAAAAATCTTACCCCAGAAAACCTTGGTCATC		
DF3S	ACA GAG ACG GAC ACA GGA TGA GATG	166 pb	0,25 uM
DF3R	CTT GAT AGG ATG CCA CGA GCCC		
DF4S	AGA CTA CCA CAT GAA CAT GAT GCA CA	138 pb	0,25 uM
DF4R	CAG ACA AAC TGG GTA TCG TTG CTC		
DF5S	GGT GCT GGT GGA GGT GAC GGA	112 pb	0,25 uM
DF5R	GAG CTT TTG GCC CTT TTC TCCC		
DHMiF	AGG AGG CGT GGC TGT GGC TAT	108 pb	0,35 uM
DHMiR	GGT ACT TGG CTC CCC CGAC		

Tabela 3: Seqüência e concentração de primers utilizados na pesquisa de variantes *RHD* parcial e tamanho em pares de base (pb) do fragmento obtido por PCR convencional multiplex.

Primer	Seqüência (5'-3')	Fragmento	Concentração
R364	TCGGTGCTGATCTCAGTGGA	111 pb	0,25 uM
R474M	ACTGATGACCATCCTCATGT		
R496	CACATGAACATGATGCACA	126 pb	0,15 uM
R621	CAAAGTGGGTATCGTTGCTG		
R648	GTGGATGTTCTGGCCAAGTT	157 pb	1,00 uM
Rex5AD2	CACCTTGCTGATCTTACC		
R898M	GTGGCTGGGCTGATCTACG	57 pb	0,25 uM
Rex6AD3	TGTCTAGTTTCTTACCGGCAAGA		
R973	AGCTCCATCATGGGCTACAA	96 pb	0,25 uM
R1068	ATTGCCGGCTCCGACGGTATC		
Rex9SD2	AACAGTTTTGCTCCTAAATATT	71 pb	1,00 uM
R1219M	AAACTTGGTCATCAAAATATTAACCT		

Tabela 4: Seqüência de primers utilizados na zigozidade *RHD* e fragmento em pares de base (pb) obtido por PCR convencional.

Primer	Seqüência (5'-3')	Fragmento
Rez7	CCTGTCCCCATGATTCAGTTACC	3.029 pb
Rnb31	CCTTTTTTTGTTTGTGTTTTGGCGGTGC	

Tabela 5: Seqüência de primers e sondas utilizados na genotipagem *RHD* fetal e fragmento em pares de base (pb) esperado por PCR em tempo real.

Primers e Sondas	Seqüência (5'-3')	Fragmento
EX4 Fwd	CTG CCA AAG CCT CTA CAC G	
EX4 Rev	ATG GCA GAC AAA CTG GGT GTC	71 pb
EX4 Probe	FAM-TTG CTG TCT GAT CTT TAT CCT CCG TTC CCT-TAMRA	
EX5 Fwd	CGC CCT CTT CTT GTG GAT G	
EX5 Rev	GAA CAC GGC ATT CTT CCT TTC	83 pb
EX5 Probe	FAM-TCT GGC CAA GTT TCA ACT CTG CTC TGC T-TAMRA	
EX10 Fwd	CCT CTC ACT GTT GCC TGC ATT	
EX10 Rev	AGT GCC TGC GCG AAC ATT	74 pb
EX10 Probe	VIC-TAC GTG AGA AAC GCT CAT GAC AGC AAA GTC T-TAMRA	
<i>SRY</i> 109	TGG CGA TTA AGT CAA ATT CGC	
<i>SRY</i> 245	CCC CCT AGT ACC CTG ACA ATG TAT T	137 pb
<i>SRY</i> Probe	VIC- AGC AGT AGA GCA GTC AGG GAG GCA GA -TAMRA	
<i>CCR5</i> Fwd	TAC CTG CTC AAC CTG GCC AT	
<i>CCR5</i> Rev	TTC CAA AGT CCC ACT GGG C	91 pb
<i>CCR5</i> Probe	FAM-TTT CCT TCT TAC TGT CCC CTT CTG GGC TC -TAMRA	

4. RESULTADOS

4.1. Seleção de pacientes e dados coletados

Este estudo incluiu 88 gestantes fenotipadas como RhD-negativo atendidas no pré-natal do CAISM no período de setembro de 2008 a outubro de 2009. A idade materna variou entre 18 e 46 anos sendo que a mediana foi de 28 anos (Tabela 6). As gestantes encontravam-se entre a 11^a e a 39^a semana gestacional (mediana de 27 semanas) sendo que duas (2,27%) pacientes encontravam-se no 1^o trimestre, 45 (51,13%) no 2^o trimestre e 41 (46,60%) no 3^o trimestre (Tabela 6 e 7). Foram coletadas também 17 amostras dos genitores paternos que estavam presentes no momento da consulta de pré-natal.

Tabela 6: Análise da idade materna em anos e da idade gestacional em semanas no momento da coleta da amostra das gestantes incluídas no estudo. Máxima expressa a maior idade encontrada e mínima a menor.

	Idade Materna (anos)	Idade Gestacional (semanas)
Média	28,09	26,32
Mediana	28,00	27
Máxima	46,00	39
Mínima	18,00	11

Tabela 7: Análise do período gestacional estratificado em trimestres das gestantes incluídas no estudo, no momento da coleta da amostra.

Período Gestacional		
Trimestre	N	%
1 ^o trimestre (11 ^a a 12 ^a semana)	02	02,27
2 ^o trimestre (13 ^a a 27 ^a semana)	45	51,13
3 ^o trimestre (28 ^a a 39 ^a semana)	41	46,60
Total	88	100,00

4.2. Resultado da pesquisa de anticorpos irregulares no plasma materno

A pesquisa de anticorpos irregulares foi realizada nos exames rotineiros de 82 gestantes. Dentre estas, treze (15,86%) pacientes encontravam-se aloimunizadas para o antígeno RhD (Tabela 8).

Tabela 8: Resultado da pesquisa de anticorpos irregulares nas gestantes incluídas nesse estudo

Pesquisa de Anticorpos Irregulares		
Resultado	N	%
Negativo	62	75,61
Positivo		
Anti-D	7	8,54
Anti-D e outro anticorpo	6	7,32
Outro Anticorpo	5	6,10
Anticorpo não identificado	2	2,44
Total	82	100,00

4.3. Resultados da genotipagem *RHD* materna

A genotipagem *RHD* foi realizada em todas as gestantes. A deleção do gene *RHD* foi confirmada em 83 amostras (94,32%). O *RHD* pseudogene foi encontrado em 3 amostras (3,41%). Duas amostras (2,27%) apresentaram resultado *RHD*-positivo e foram caracterizadas como negativas para *RHD* fraco e positivas para *RHD* parcial, sendo classificadas como D parcial tipo DFR (Tabela 9).

Tabela 9: Resultado da genotipagem *RHD* materna realizada com as amostras de DNA das gestantes coletadas.

Genotipagem <i>RHD</i> Materna		
Resultado	N	%
<i>RHD</i> Negativo	83	94,32
<i>RHD</i> Pseudogene +	3	3,41
<i>RHD</i> Positivo	2	2,27
Total	88	100,00

4.4. Resultados da genotipagem *RHD* paterna

A genotipagem *RHD* foi realizada em todas as 17 amostras paternas coletadas. O genótipo *RHD* positivo foi encontrado em 15 amostras (88,24%) e a deleção do gene *RHD* foi encontrada em 2 amostras (11,76%). O *RHD* pseudogene não foi encontrado em nenhuma amostra paterna (Tabela 10).

Tabela 10: Resultado da genotipagem *RHD* paterna.

Genotipagem <i>RHD</i> Paterna		
Resultado	N	%
<i>RHD</i> Negativo	2	11,76
<i>RHD</i> Positivo	15	88,24
<i>RHD</i> Pseudogene +	0	0,00
Total	17	100,00

4.5. Resultados da zigozidade *RHD* paterna

A zigozidade *RHD* paterna foi realizada em todas as amostras paternas. Os genótipos *RHD+*/*RHD+* homocigoto e o *RHD+*/*RHD-* heterocigoto foram encontrados em 5 (29,41%) e 10 (58,83%) amostras, respectivamente. Em duas amostras (11,76%) o resultado da zigozidade *RHD* confirmou o genótipo *RHD* negativo previamente identificado pela genotipagem *RHD* convencional (Tabela 11).

Tabela 11: Resultado da zigozidade *RHD* paterna.

Zigozidade <i>RHD</i> Paterna		
Resultado	N	%
Homocigoto	5	29,41
Heterocigoto	10	58,83
<i>RHD</i> negativo	2	11,76
Total	17	100,0

4.6. Resultados da padronização das reações por qPCR por TaqMan

4.6.1. Resultado do teste de amplificação dos primers e sonda em qPCR

Foi realizada uma amplificação inicial por PCR em tempo real para cada região separadamente (*RHD* exon4, exon5, exon10, *SRY* e *CCR5*). O resultado demonstrou que o ensaio estava funcionando corretamente (Figura 7). Todos os controles negativos (NTC) não apresentaram curva de amplificação. Isso indica que não houve contaminação dos reagentes.

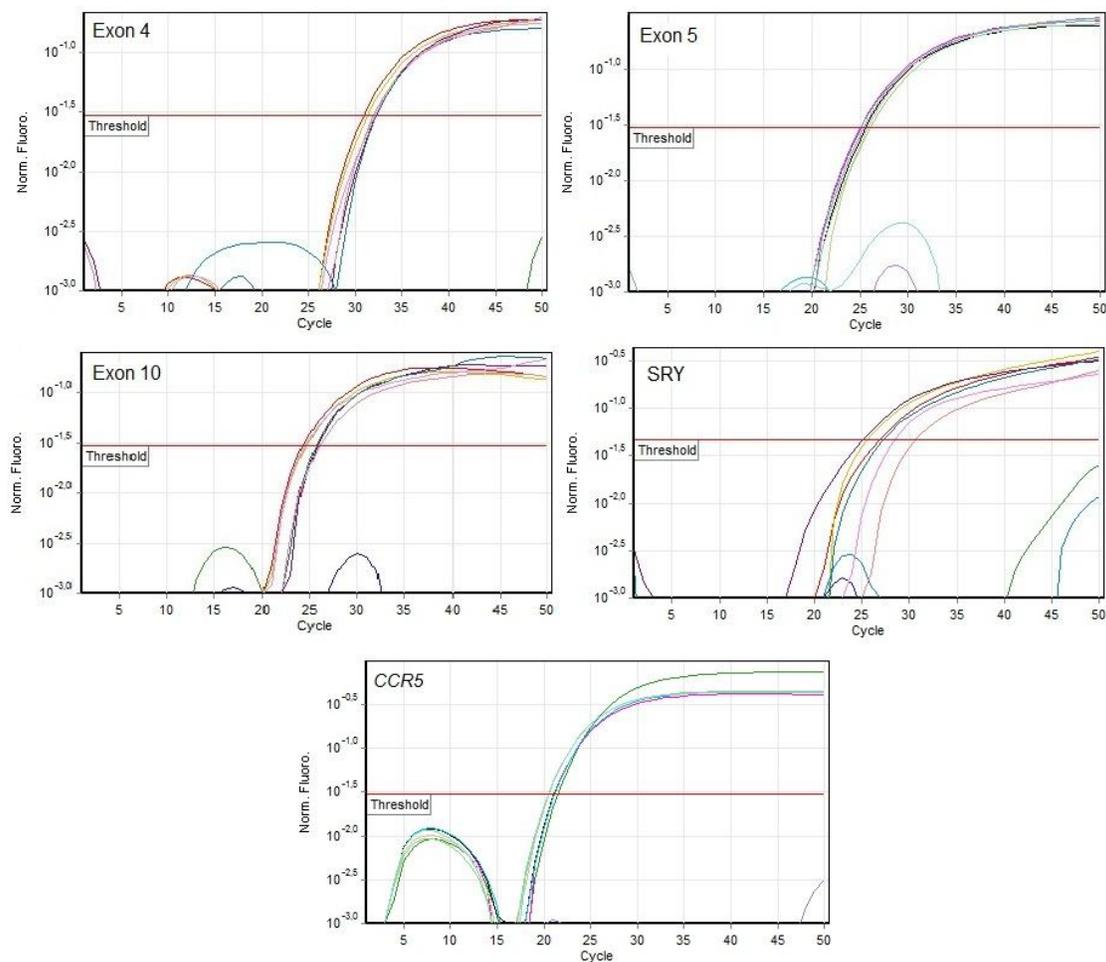


Figura 7: Curva de amplificação de reação de PCR em tempo real demonstrando que o ensaio está funcionando com as concentrações de primers e sondas de 150nM e 200nM respectivamente.

4.6.2. Resultado da padronização de concentração de primers em qPCR (SYBR Green)

A curva de concentração de primer demonstrou que as diferentes concentrações de primers apresentaram CT próximos para os ensaios de *RHD* exon 4, exon 5, exon 10 e *SRY* (Figura 8). A menor concentração de primers a apresentar o menor CT foi de 300nM para o gene *RHD* (exon 4) e de 150nM para os demais exons do gene *RHD* e para o gene *SRY*. Assim optou-se por utilizar essas concentrações de primer na próxima etapa da padronização.

Para o ensaio do gene *CCR5*, as diferentes concentrações de primers apresentaram CT distintos. A menor concentração de primers a apresentar o menor CT foi de 300 nM (Figura 8). Diante dos resultados obtidos, optou-se por utilizar essa concentração de primer na curva de concentração de sonda.

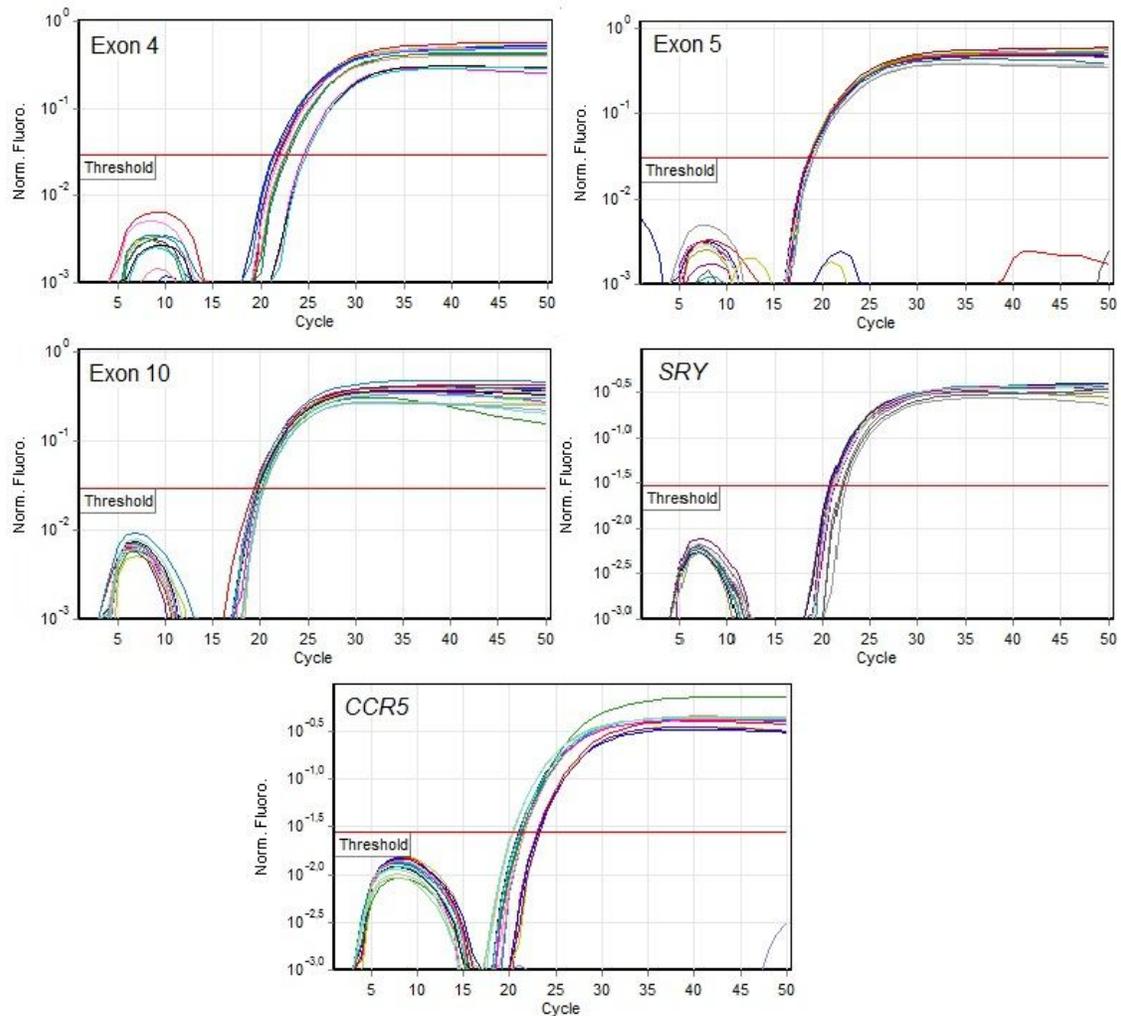


Figura 8: Curva de amplificação de reação de PCR em tempo real demonstrando a pequena variação de amplificação com diferentes concentrações de primers exceto para o ensaio do *CCR5*.

4.6.3. Resultado da padronização de concentração de sondas em qPCR (TaqMan)

A curva de concentração de sonda foi realizada com as concentrações de primers estabelecidas na etapa anterior, variando-se apenas as concentrações de sonda. A reação de qPCR para *RHD* (exon 4, 5 e 10), *SRY* e *CCR5* funcionou corretamente, apresentando curva de amplificação para todas as concentrações.

Os resultados obtidos demonstraram que 50nM de sonda é a concentração ideal para todos os ensaios de *RHD* exon 4, 5, 10, *SRY* e *CCR5* (Figura 9).

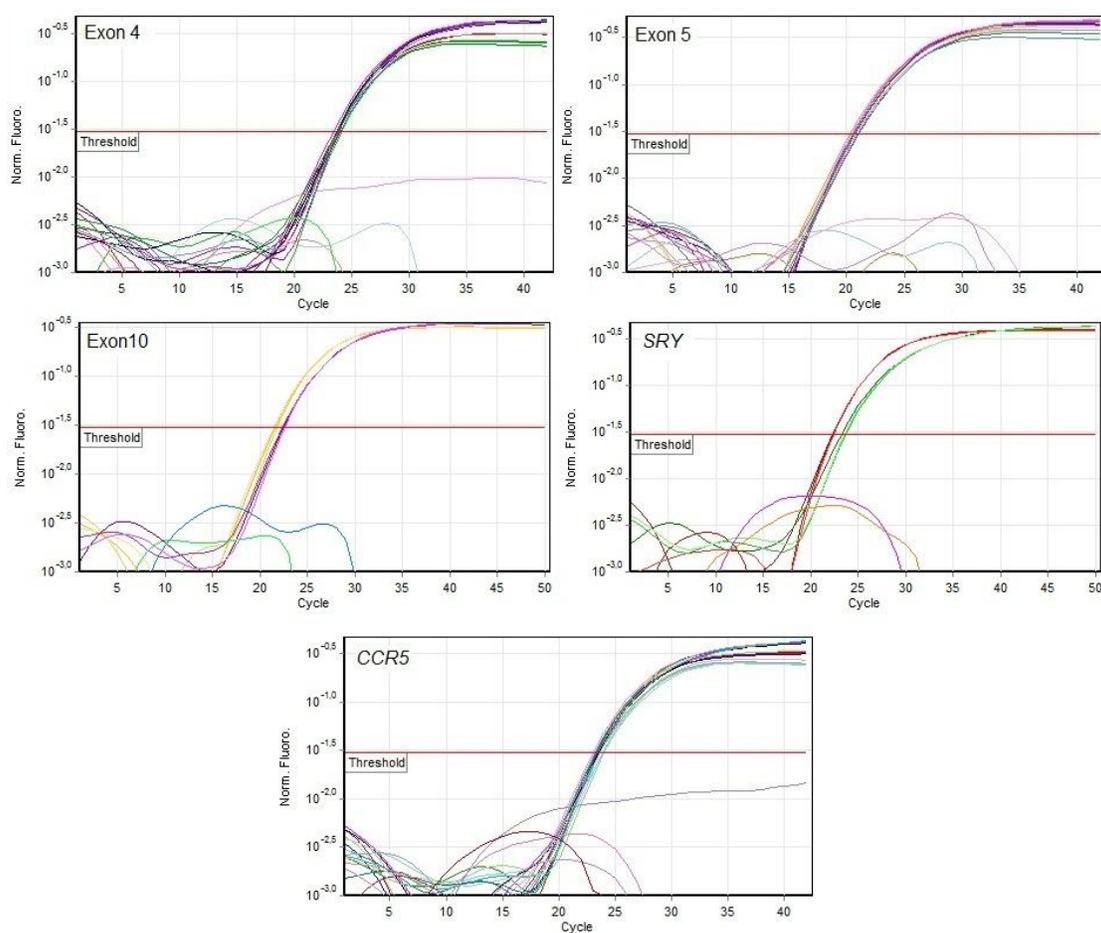


Figura 9: Curva de amplificação de reação de PCR em tempo real demonstrando a pequena variação de amplificação com diferentes concentrações de sonda.

4.6.4. Resultado da curva de eficiência em singleplex

Após estabelecer as concentrações de primers e sondas, realizou-se a curva de eficiência para o gene *RHD* (exon 4, 5 e 10), *SRY* e *CCR5*. Esse teste apresentou ótimos resultados para o gene *RHD*. Obteve-se eficiência máxima e *slope* entre -3,30 e -3,40 para os exons 4, 5 e 10. A partir deste resultado concluiu-se que as concentrações estavam adequadas para o gene *RHD* (Figura 10).

Para o gene *SRY* e *CCR5*, a reação não apresentou eficiência máxima, portanto alguns ajustes foram necessários. Para o ensaio com *CCR5* repetimos a curva de eficiência sob mesmas condições da reação anterior. Para o *SRY*, aumentamos a concentração de sonda de 50nM para 100nM.

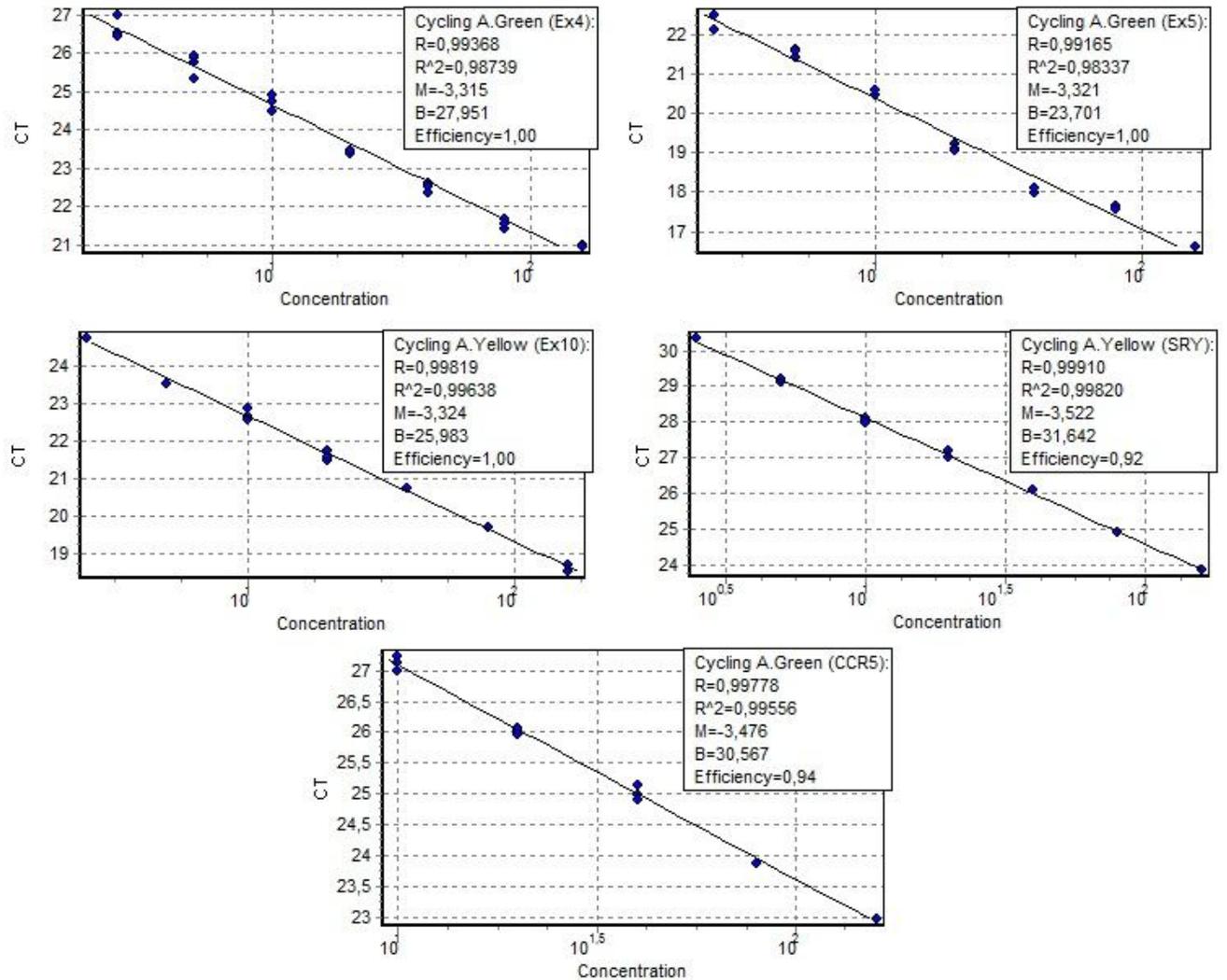


Figura 10: Curva de eficiência de reação de PCR em tempo real em singleplex. O gene *RHD* (exon 4, 5 e 10) apresentou máxima eficiência de reação. Os genes *SRY* e *CCR5* apresentaram eficiência inferior ao esperado. **M**=*Slope*, inclinação da reta; **Efficiency** = eficiência; **Concentration** = concentração.

A repetição da curva de eficiência para *CCR5* sob as mesmas condições da reação anterior apresentou resultados satisfatórios. Após a exclusão de alguns pontos da reta (menores concentrações), obteve-se eficiência máxima (1,0) e *slope* (M) de -3,32 (Figura 11). Diante desse resultado, concluiu-se que o ensaio do gene *CCR5* estava sob as condições adequadas para ser utilizado como controle interno da reação de genotipagem *RHD* fetal.

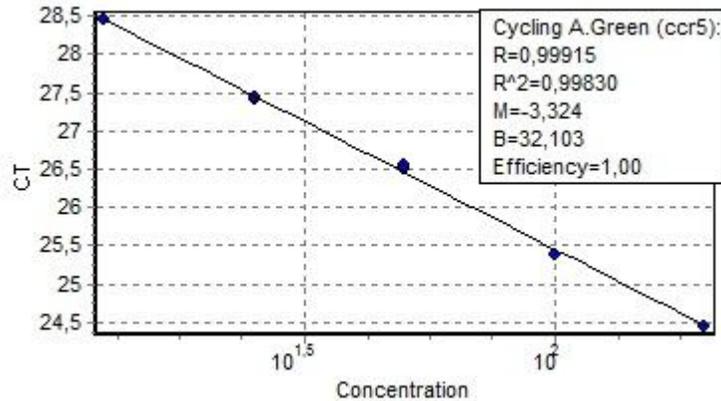


Figura 11: Curva de eficiência de reação de PCR em tempo real em singleplex. O gene *CCR5* apresentou máxima eficiência de reação utilizando 50nM de concentração de sonda e 300nM de primer. **M=Slope**, inclinação da reta; **Efficiency** = eficiência; **Concentration** = concentração.

4.6.5. Resultado da curva de eficiência em multiplex

As curvas de eficiência em multiplex foram realizadas em duas reações. Na reação *RHD* exon4/10, o ensaio do exon 4 do gene *RHD* marcado com o fluoróforo FAM (verde) foi realizado no mesmo tubo que o ensaio exon 10 marcado com o fluoróforo VIC® (amarelo). Na reação *RHD* exon5/*SRY*, o ensaio exon 5 do gene *RHD* marcado com o fluoróforo FAM (verde) foi realizado no mesmo tubo que o ensaio *SRY* marcado com o fluoróforo VIC® (amarelo).

O resultado obtido para o ensaio *RHD* exon 4/10 foi satisfatório. Com a exclusão de alguns pontos da curva (as duas maiores concentrações de DNA) foi possível alcançar uma eficiência de 1,03 e 0,98 para *RHD* exon 4 e exon 10, respectivamente (Figura 12a). Assim, a curva final foi composta por 5 concentrações (40, 20, 10, 5 e 2,5 ng).

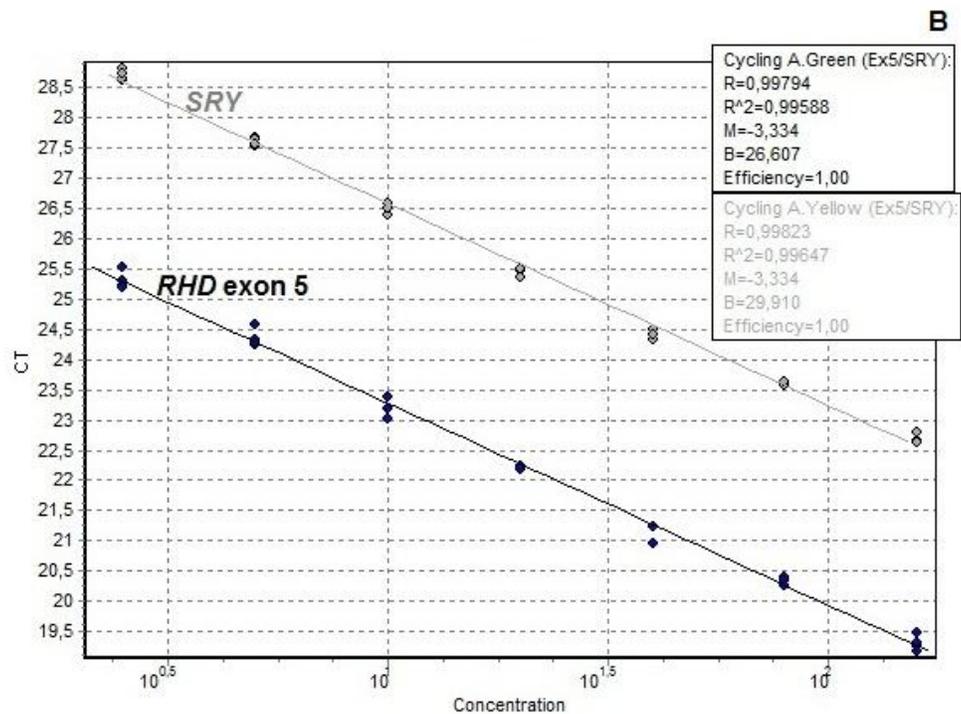
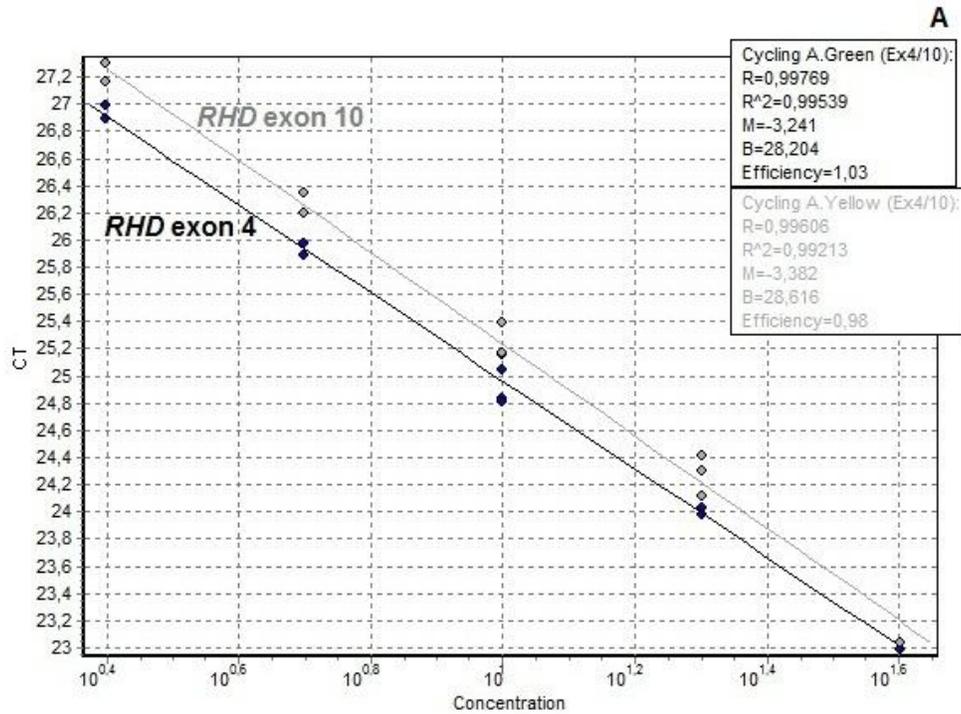


Figura 12: Curva de eficiência de reação de PCR em tempo real em multiplex. (A) Reação *RHD* exon 4 e exon 10 apresentando resultados satisfatórios e (B) Reação *RHD* exon 5 e *SRY* apresentando máxima eficiência de reação. **M**=*Slope*, inclinação da reta; **Efficiency** = eficiência; **Concentration** = concentração.

O resultado obtido para o ensaio *RHD* exon 5 e *SRY* foi excelente. A eficiência máxima foi alcançada para ambos os genes, sem a necessidade de excluir nenhum dos pontos da curva (Figura 12b).

Diante desses resultados, concluiu-se que os três ensaios (*RHD* exon 4 associado ao exon 10; *RHD* exon 5 associado ao *SRY*; e *CCR5*) estavam sob as condições adequadas para serem utilizados na reação da genotipagem *RHD* fetal. As concentrações estabelecidas para os genes *RHD* (exons 4, 5 e 10), *SRY* e *CCR5* estão descritas na Tabela 12.

Tabela 12: Concentração de primers e sondas para os genes *RHD*, *SRY* e *CCR5* estabelecidas após testes de padronização.

Primer	Concentração de primer	Concentração de sonda
<i>RHD</i> Ex4	300 nM	50 nM
<i>RHD</i> Ex 5	150 nM	50 nM
<i>RHD</i> Ex 10	150 nM	50 nM
<i>SRY</i>	150 nM	100 nM
<i>CCR 5</i>	300 nM	50 nM

A partir desses resultados foi possível iniciar os testes de genotipagem *RHD* fetal através do plasma materno.

4.7. Resultados da genotipagem *RHD* fetal por PCR em tempo real

A genotipagem *RHD* fetal por PCR em tempo real foi realizada em 88 amostras de DNA fetal. O genótipo *RHD* positivo foi identificado em 58 (65,91%) amostras. Vinte e sete (30,68%) amostras apresentaram a ausência completa do gene *RHD*. Três (3,41%) amostras apresentaram amplificação apenas para o exon 10 indicando a presença de uma variante *RHD* como o *RHD* pseudogene ou

gene híbrido (*RHD-CE(3-8)-D^S*) e portanto estes 3 fetos foram classificados como RhD-negativo (Tabela 13).

Dentre as 30 amostras genotipadas como *RHD* negativo, a presença do gene *SRY* foi detectada em 11 (36,67%) amostras. A detecção do gene *SRY* demonstra a presença de DNA fetal proveniente de um feto do sexo masculino. O gene *SRY* não foi detectado em 19 (63,33%) amostras, indicando fetos do sexo feminino. Contudo, nesses casos o gene *CCR5* foi detectado, confirmando o sucesso da extração de DNA. (Tabela 13)

Tabela 13: Resultados da genotipagem *RHD* fetal em 88 gestantes, usando o plasma materno como fonte de DNA fetal, estratificada por período gestacional.

Idade Gestacional (semanas)	N	<i>RHD</i> +		<i>RHD</i> -		Acurácia da genotipagem <i>RHD</i> Fetal
		Masc	Fem	Masc	Fem	
11-12	2	0	1	1	0	100%
13-27	45	16	13	4	12 ^α	100%
28-39	41	17	11	6	7 ^β	100%
Total	88	33	25	11	19	100%

* A acurácia da genotipagem *RHD* fetal foi determinada através da comparação dos resultados obtidos na genotipagem *RHD* fetal através do plasma materno com os resultados da fenotipagem RhD neonatal. **Masc.:** indivíduos de sexo masculino; **Fem.:** indivíduos de sexo feminino. **α e β:** Duas e uma amostra, respectivamente, apresentaram amplificação apenas para *RHD* exon 10 e *CCR5* indicando a presença de uma possível variante *RHD* (*RHD Ψ* ou gene híbrido).

A determinação do genótipo *RHD* através de PCR em tempo real para cada região gênica foi possível em todas as amostras de plasma materno. Entretanto, 10% das reações necessitaram ser repetidas: 6,82% das reações apresentaram resultados inconclusivos *RHD* e 3,41% apresentaram genótipo *RHD* variante (Tabela 14). Essas reações foram realizadas novamente e então foi possível determinar o genótipo *RHD* fetal. As amostras que apresentaram

amplificação apenas para o exon 10 do gene *RHD* foram repetidas a fim de se confirmar esse resultado. A repetição da reação ratificou o genótipo *RHD* variante nessas três amostras. Além disso, cerca de 8% das reações apresentaram amplificação para o controle negativo ou NTC e precisaram ser realizadas novamente.

Tabela 14: Critérios de interpretação do resultado da genotipagem *RHD* fetal de acordo com o padrão de amplificação de 3 replicatas da reação.

Exon 4	Exon 5	Exon 10	Conclusão	N	Total	%
2 ou 3	2 ou 3	2 ou 3	<i>RHD+</i>	47	55,00	62,50
2 ou 3	2 ou 3	1	<i>RHD+</i>	5		
2 ou 3	1	2 ou 3	<i>RHD+</i>	3		
1	2 ou 3	2 ou 3	<i>RHD+</i>	0		
0	0	2 ou 3	<i>RHD</i> variante	3	3,00	3,41
0	0	0	<i>RHD-</i>	20	24,00	27,27
1	0	0	<i>RHD-</i>	0		
0	1	0	<i>RHD-</i>	4		
0	0	1	<i>RHD-</i>	0		
0	2 ou 3	2 ou 3	Inconclusivo	1	6,00	6,82
2 ou 3	0	2 ou 3	Inconclusivo	0		
2 ou 3	2 ou 3	0	Inconclusivo	1		
0	2 ou 3	0	Inconclusivo	1		
2 ou 3	0	0	Inconclusivo	3		
1	1	1	Inconclusivo	0		
Total				88	100%	

Quanto à análise do gene *SRY*, 17,05% das reações apresentaram amplificação em apenas 1 replicata do total de 3, não sendo possível definir o sexo do feto (Tabela 15). Essas reações foram repetidas e assim, foi possível determinar o sexo fetal em todas as amostras.

Tabela 15: Critérios de interpretação do resultado da determinação do sexo fetal através da identificação do gene *SRY*, acordo com o padrão de amplificação de 3 replicatas da reação.

SRY	Conclusão	N	%
2 ou 3	Masculino	33	37,50
0	Feminino	40	45,45
1	Inconclusivo	15	17,05
Total		88	100

4.7.1. Resultados dos parâmetros de validação do teste diagnóstico

Após correlacionar os resultados da genotipagem *RHD* fetal com os resultados da fenotipagem RhD, uma tabela de dupla entrada foi construída a fim de calcular os parâmetros de validação do teste diagnóstico (Tabela 16).

Tabela 16: Correlação dos resultados obtidos através da genotipagem *RHD* fetal no plasma materno com os resultados obtido através da fenotipagem RhD neonatal.

		Fenotipagem RhD Neonatal	
		Positivo	Negativo
Genotipagem <i>RHD</i> fetal no plasma materno	Positivo	Verdadeiro positivo 58	Falso positivo
	Negativo	Falso negativo	Verdadeiro negativo 30

Tendo por base a tabela de correlação de resultados, foi possível calcular a sensibilidade, especificidade, acurácia e valor preditivo positivo e negativo da genotipagem *RHD* fetal.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{Verdadeiro Positivo}}{\text{Verdadeiro Positivo} + \text{Falso Negativo}} = \frac{58}{58} = 1$$

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{Verdadeiro Negativo}}{\text{Verdadeiro Negativo} + \text{Falso Positivo}} = \frac{30}{30} = 1$$

$$\text{Acurácia} = \frac{\text{Verdadeiro Positivo} + \text{Verdadeiro Negativo}}{\text{Total}} = \frac{88}{88} = 1$$

$$\text{VPP} = \frac{\text{Verdadeiro Positivo}}{\text{Verdadeiro Positivo} + \text{Falso Positivo}} = \frac{58}{58} = 1$$

$$\text{VPN} = \frac{\text{Verdadeiro Negativo}}{\text{Verdadeiro Negativo} + \text{Falso Negativo}} = \frac{30}{30} = 1$$

Dessa forma, os índices de acurácia, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo encontrados nesse estudo foram de 100% quando comparados os resultados da genotipagem *RHD* fetal com os resultados da fenotipagem RhD realizados a partir do sangue periférico ou sangue de cordão do neonato.

5. DISCUSSÃO

A descoberta de DNA fetal livre no plasma materno foi um grande avanço na prevenção e acompanhamento da doença hemolítica perinatal, pois possibilitou a determinação de grupos sanguíneos fetais por procedimentos não-invasivos (LO *et al.*, 1998a; DANIELS *et al.*, 2006). Desde então, vários protocolos de genotipagem *RHD* fetal utilizando DNA extraído do plasma materno foram descritos (DANIELS *et al.*, 2009a).

O protocolo utilizado no presente trabalho demonstrou que a genotipagem *RHD* fetal através da análise do plasma materno por PCR em tempo real com amplificação de 3 exons do gene *RHD* e a inclusão dos controles internos *SRY* e *CCR5* pode ser aplicado na população do Brasil. Mas, para que se obtenha uma alta sensibilidade e especificidade, a metodologia empregada requer uma padronização criteriosa observando-se uma série de requisitos e controles.

O DNA deve ser isolado do plasma materno através de dupla-centrifugação da amostra de sangue periférico. A centrifugação deve ser realizada o mais rápido possível após a coleta com o objetivo de reduzir a proporção de DNA materno decorrente da lise leucocitária. Além disso, este procedimento auxilia a remoção de material celular residual procedente de uma gestação anterior. O laboratório de referência internacional de grupos sanguíneos de Bristol (IBGRL, UK) recomenda que o processamento do sangue materno seja realizado dentro de 48 horas após a coleta. Estudos experimentais demonstraram que o prazo de até sete dias pode ser aceitável (DANIELS *et al.*, 2009a).

Alguns pesquisadores relataram que o congelamento do plasma antes da obtenção do material genético ou por um longo período após a extração de DNA pode causar resultados falsos ou inconclusivos (BROJER *et al.*, 2005; FINNING *et al.*, 2008; MÜLLER *et al.*, 2008). Alternativamente, esses autores recomendam manter o plasma a 4°C por até cinco dias.

No presente trabalho, as amostras foram centrifugadas no máximo até duas horas após a coleta. O plasma obtido foi então centrifugado por duas vezes e, a seguir, armazenado a -20°C por cerca de um ano até o momento da extração do DNA. Acreditamos que o longo período de armazenamento não tenha causado

interferências significativas na qualidade e/ou quantidade de DNA fetal tendo em vista que a amplificação do controle interno *CCR5* foi obtida em todas as amostras.

Tendo em vista que o DNA fetal livre no plasma materno encontra-se em baixas concentrações e susceptível a degradações, na identificação do gene *RHD* recomenda-se ainda a utilização de sondas. A técnica de qPCR é muito trabalhosa e requer extensiva padronização para que possamos obter resultados confiáveis. Primers e sondas em concentrações inadequadas podem ocasionar amplificações inespecíficas ou baixa eficiência da reação. Assim, o estabelecimento das condições ideais de reação é de fundamental importância.

Devido à alta complexidade do gene *RHD*, os primers e sondas devem ser desenhados cuidadosamente. A presença de inúmeras variantes torna essencial a análise de pelo menos duas regiões gênicas para se evitar a obtenção de resultados falsos (BROJER *et al.*, 2005; HROMADNIKOVA *et al.*, 2005; DANIELS *et al.*, 2009a). Assim, é importante verificar que ocorreu a amplificação de todos os exons antes de considerar um resultado *RHD* positivo. Este procedimento minimiza a ocorrência de resultados falsos e, além disso, permite a identificação de variantes do gene *RHD*. Com a finalidade de aumentar a acurácia dos resultados, recomenda-se que as reações de amplificação do gene *RHD* sejam realizadas pelo menos em triplicatas para cada região do gene *RHD* estudada bem como a inclusão de controles positivos e negativos.

Não existe um consenso na literatura, sobre quais regiões do gene *RHD* devem ser amplificadas para a genotipagem fetal. Exons 4, 5, 6, 7 e 10 são as regiões gênicas mais utilizadas atualmente (DANIELS *et al.*, 2009b) (Tabela 17). Os protocolos que utilizam apenas a amplificação dos exons 7 e 10 não são recomendados para a análise de populações com descendentes de Africanos (DANIELS *et al.*, 2009a). Estes protocolos podem ocasionar resultados falso-positivos no caso de fetos que apresentem o gene *RHD* Ψ e o gene híbrido *RHD-CE-D^s*. Nestes casos, para se deduzir o fenótipo RhD corretamente, recomenda-se a amplificação de uma região que possa abranger os exons 4 e 5 do gene

RHD. Sempre que possível, os genótipos D fraco e D parcial que determinam antígenos RhD variantes devem ser investigados através da amplificação dos exons 7 ou 10 (DANIELS *et al.*, 2009a).

Em nosso estudo, os exons 4, 5 e 10 foram selecionados para serem amplificados. Com a utilização desta estratégia foi possível identificar as variantes *RHD*, tais como, *RHD* pseudogene e genes híbridos. Este protocolo nos permitiu identificar três amostras que apresentaram amplificação apenas para os genes *RHD* exon 10 e *CCR5* (Tabela 13). Este resultado indica a presença de uma possível variante *RHD* como o *RHD* pseudogene ou gene híbrido (*RHD-CE(3-8)-D^S*) que impedem a expressão do antígeno RhD e portanto o fenótipo deduzido foi RhD-negativo.

Uma limitação importante em todos os testes que utilizam DNA fetal obtido do plasma materno é a inclusão de controles internos da reação com o objetivo de assegurar a presença de DNA fetal. A grande quantidade de DNA materno presente na preparação do DNA interfere na obtenção de um controle de amplificação de material genético exclusivamente fetal.

Marcadores polimórficos de DNA que permitam a diferenciação de indivíduos através da identificação de inserção ou deleção de nucleotídeos na sequência de DNA podem ser utilizados na diferenciação entre DNA fetal e materno. Entretanto, esses polimorfismos não podem ser considerados como controles internos verdadeiros, tendo em vista que não é possível incorporá-los na mesma reação multiplex de amplificação do gene *RHD*. Na maioria dos casos é necessário empregar um grande número de polimorfismos para que o mesmo se torne informativo. A inclusão destes marcadores torna o teste trabalhoso demorado e um consumo maior reagentes aumentando ainda mais o custo da reação. Em nosso trabalho, optamos por substituir os marcadores polimórficos com a utilização dos genes *SRY* e *CCR5*.

O gene *SRY* tem sido considerado pela literatura como um ótimo controle interno e demonstra com segurança a presença de DNA fetal. No entanto,

como este gene está localizado no cromossomo Y é válido apenas em casos de fetos masculinos.

A amplificação do gene *CCR5* não distingue a presença de DNA fetal e materno e, portanto não comprova a presença de DNA fetal. Contudo, este controle demonstra a eficácia da extração e a presença de DNA e por esse motivo tem sido utilizado como controle interno da reação por diversos autores (FINNING *et al.*, 2002; HARPER *et al.*, 2004; MINON *et al.*, 2006; FINNING *et al.*, 2008; FINNING *et al.*, 2009).

Em nosso estudo, das trinta amostras genotipadas como *RHD*-negativo, em onze fetos foi detectado o gene *SRY* e eram do sexo masculino. Nas 19 amostras restantes, o gene *SRY* não foi detectado e os fetos eram femininos e *RhD*-negativo ao nascimento. Apesar de não ter sido comprovada a presença de DNA fetal nessas amostras de plasma materno, os dados obtidos ao nascimento confirmaram os nossos achados.

Os nossos resultados da genotipagem *RHD* fetal foram totalmente concordantes com o fenótipo *RhD* (acurácia de 100%) identificado nos recém-nascidos. Dentre os nossos resultados, três fetos apresentaram na genotipagem fetal um gene *RHD* variante. Esses achados sugerem fortemente que a análise de regiões que diferenciem o gene *RHD* ativo do gene *RHD* Ψ inativo é essencial a fim de evitar resultados falso-positivos. A acurácia dos resultados encontrados neste estudo está próxima a encontrada na literatura em estudos que utilizaram a mesma metodologia de PCR em tempo real com amplificação de no mínimo 2 regiões do gene *RHD*. (Tabela 17).

Tabela 17: Revisão bibliográfica de estudos de genotipagem *RHD* fetal por PCR em tempo real.

Autor	N	Idade Gestacional (semanas)	<i>RHD</i> Exons	Acurácia	Controles
Finning <i>et al.</i> , 2002	137	8-42	4, 5, 6, 10	100%	<i>SRY</i> e <i>CCR5</i>
Finning <i>et al.</i> , 2004	226	8-42	4, 5, 10	99%	<i>CCR5</i> , <i>SRY</i> ,
Harper <i>et al.</i> , 2004	2	13-16	4, 5 e 10	100%	<i>SRY</i> , <i>CCR5</i>
Brojer <i>et al.</i> , 2005	255	5-39	4, 7, 10	100%	β -actina, <i>SRY</i> e STR
Hromandnikova <i>et al.</i> , 2005	45	11-40	7, 10	100%	β -Globina, <i>SRY</i> ,
Daniels <i>et al.</i> , 2006	327	8-40	4, 5, 10	99%	<i>SRY</i> , STR
Finning <i>et al.</i> , 2008	1997	8-38	5 e 7	99,1%	<i>CCR5</i>
Minon <i>et al.</i>, 2008	563	10-38	4, 5, 10	100%	<i>CCR5</i> e <i>SRY</i>
Müller <i>et al.</i> , 2008	1022	6-32	5 e 7	100%	β -Globina
Presente trabalho	88	11-39	4, 5, 10	100%	<i>CCR5</i> e <i>SRY</i>

Um trabalho muito similar ao nosso foi realizado por Minon *et al.* (2008). Estes autores realizaram a genotipagem *RHD* fetal em 563 amostras utilizando a mesma metodologia para identificar os exons 4, 5 e 10 do gene *RHD* e controles (*SRY* e *CCR5*). Encontraram 10 amostras discrepantes que apresentaram amplificação apenas para o exon 10 do gene *RHD*. Essas amostras foram classificadas como RhD-negativo mas estudos complementares com DNA materno e paterno demonstraram a presença do *RHD Ψ* ou *RHD-CE-D* em 6 amostras maternas e em 4 paternas, reforçando a importância da realização da genotipagem *RHD* materna e paterna.

Neste estudo, antes de iniciar os testes de genotipagem fetal optou-se por confirmar o fenótipo RhD-negativo de todas as gestantes através da genotipagem *RHD* e realizar a zigosidade *RHD* amostras paternas, quando possível. Nesta análise foi possível identificar o gene inativo *RHD Ψ* em 3 amostras maternas, que também foi investigado no feto. Encontramos ainda, em duas gestantes, previamente classificadas como RhD-negativo, o genótipo D parcial DFR, uma variante do antígeno RhD que se expressa fracamente nas hemácias e que dependendo do reagente utilizado pode ser classificada como RhD-negativo na rotina. Estes resultados demonstraram a importância de realizar a genotipagem

RHD materna para confirmar o fenótipo RhD materno e também para direcionar a investigação fetal e evitar resultados falso-positivos devido a presença de genes inativos.

A genotipagem *RHD* paterna demonstrou a ausência do gene *RHD* em 11,76% das 17 amostras analisadas. Entre as 15 amostras *RHD+*, 29,41% eram homozigotas e 58,83% heterozigotas. De acordo com estes resultados foi possível deduzir o fenótipo RhD-positivo nos fetos de pais homozigotos, posteriormente confirmados através da genotipagem *RHD* fetal. Esta análise, quando possível, tem sido recomendada para a indicação precisa da genotipagem *RHD*, pois somente fetos de pais heterozigotos para o gene *RHD* ou *RHD*-negativo podem apresentar o fenótipo RhD-negativo.

O presente estudo obteve elevado grau de acurácia e de amplificação, mesmo em amostras coletadas no início da gestação, indicando a superioridade da técnica de PCR em tempo real por TaqMan quando comparada com a técnica de PCR convencional.

A maior precisão e sensibilidade da metodologia de PCR em tempo real por TaqMan pode ser evidenciada em nossa população através da comparação dos resultados encontrados neste estudo com os resultados do estudo anteriormente realizado com a metodologia de PCR convencional por Machado *et al.* (2006). Estes autores obtiveram acurácia de 97%, com um caso de falso-positivo de amostra coletada no terceiro trimestre e um caso de falso-negativo no final do primeiro trimestre. A amplificação de DNA fetal foi obtida em 93% das amostras. As seis amostras que não apresentaram amplificação foram coletadas no segundo e terceiro trimestre de gestação.

Alguns trabalhos da literatura que utilizaram o método de PCR em tempo real, mas que amplificaram uma única região gênica ou que não incluíram controles internos relatam a ocorrência de resultados falso-positivos e falso-negativos (menos de 2% das amostras) (FINNING *et al.*, 2008). Outra causa potencial de erro é o histórico materno de transplante de órgãos sólidos. O DNA isolado do plasma de gestantes RhD-negativo transplantadas pode conter material

genético proveniente da apoptose de células do órgão transplantado, confundindo o resultado da genotipagem (LO *et al.*, 1998a; MINON *et al.*, 2006). Esses dados destacam a importância de investigar a história clínica das gestantes.

A principal vantagem da genotipagem *RHD* fetal através do plasma materno é a de tornar o acompanhamento das gestações com alto risco de desenvolver DHPN mais fácil e seguro. A distinção de gestantes que necessitam de um acompanhamento rigoroso daquelas que não apresentam risco de DHPN auxilia na decisão dos procedimentos invasivos. Além disso, traz ainda um grande benefício para o diagnóstico pré-natal de gestantes não-aloimunizadas no auxílio à indicação da profilaxia Rh durante a gestação.

Na população estudada, 34% das gestantes RhD-negativo geraram fetos RhD-negativos. Caso a genotipagem tivesse sido realizada na rotina pré-natal dessas pacientes, representaria uma diminuição no uso de imunoglobulina durante a gestação com uma economia de recursos. Esta conclusão é também confirmada pela literatura. Em uma população predominantemente caucasiana, aproximadamente 38% das gestações são de fetos RhD-negativos e recebem a imunoglobulina Rhlg desnecessariamente (RIJNDERS *et al.*, 2004; FINNING *et al.*, 2008; van der SCHOOT *et al.*, 2008; DANIELS *et al.*, 2009a). Com a aplicação rotineira e automatizada dessa técnica, o custo do teste pode ser substancialmente menor que o da imunoglobulina, apesar de uma avaliação de custo rigorosa deste método ainda não ter sido realizada.

Embora o método de PCR em tempo real para análise de DNA fetal no plasma materno seja de difícil padronização, trabalhoso em sua execução devido ao fato de requerer amplificações diferentes e em replicatas e, muitas vezes a repetição das reações, o resultado mostrou ser bastante sensível e de alta acurácia.

Os dados obtidos com o presente estudo demonstraram, pela primeira vez, um protocolo eficiente de genotipagem *RHD* fetal através da utilização de plasma materno em uma população do Brasil que pode ser seguramente aplicado na clínica.

6. CONCLUSÕES

Considerando os objetivos do presente trabalho, as condições em que foi realizada a genotipagem *RHD* fetal através da análise do plasma materno em uma população no Brasil, podemos concluir que:

1. A genotipagem *RHD* materna permitiu a identificação de variantes que podem influenciar na caracterização do fenótipo RhD das gestantes e na condução da genotipagem *RHD* fetal.
2. A determinação da zigosidade *RHD* paterna pode auxiliar na indicação precisa da genotipagem *RHD* fetal.
3. Houve 100% de concordância entre os resultados da genotipagem *RHD* fetal através da análise do plasma materno e da fenotipagem RhD realizada no sangue do neonato.
4. A amplificação de três regiões (exons 4, 5 e 10) do gene *RHD* foi importante para a correta interpretação dos resultados e dedução do fenótipo RhD fetal pois a amplificação do exon 10 apenas pode indicar a presença do pseudogene *RHD* Ψ ou do gene híbrido *RHD-CE-D^s*.
5. A inclusão do gene *CCR5* como controle interno permitiu demonstrar a eficiência da extração do DNA do plasma materno. A utilização do gene *SRY* validou o resultado da genotipagem *RHD* fetal em fetos do sexo masculino e permitiu definir o sexo fetal em todas as amostras analisadas, com acurácia de 100%.
6. A genotipagem *RHD* fetal realizada através da análise do plasma em uma população do Brasil apresentou índices de acurácia, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo de 100%.
7. Este trabalho possibilitou o desenvolvimento de um protocolo viável para genotipagem *RHD* fetal não-invasiva em DNA obtido de plasma materno em uma população no Brasil.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIZADEH M, BERNARD M, DANIC B, DAURIAC C, BIREBENT B, LAPART C *et al.* Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. **Blood**, 99:4618-25, 2002.
- AVENT ND, REID ME. The Rh Blood group system: a review. **Blood**, 95:375-387, 2000.
- BAIOCHI E, NARDOZZA LMM. Aloimunização. **Rev Bras Ginecol Obstet**, 31(6):311-9, 2009.
- BAIOCHI E, CAMANO L, BORDIN JO. Avaliação da hemorragia feto-materna em puérperas com indicação para ministração de imunoglobulina anti-D. **Cad Saúde Pública**, 21(5):1357-65, 2005.
- BENNETT PR, le van KIM C, COLIN Y, WARWICK RM, CHÉRIF-ZAHAR B, FISK NM. Prenatal determination of fetal RhD type by DNA amplification. **N Engl J Med**, 329: 607-10, 1993.
- BOWMAN, JM. Antenatal suppression of Rh alloimmunization. **Clin Obstet Gynecol**, 34:296-303, 1991.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas - Área Técnica da Saúde da Mulher. Gestação de Alto Risco: Manual Técnico. 4ª edição. Brasília (DF); 2000. 164p.
- BRENNER M, MELLO LR, JOB F. Imuno-hematologia. In: SCROFERNEKER ML. Imunologia básica e aplicada. Porto Alegre: **Editora Sagra Luzzato** 1998. p.502-17
- BROJER E, ZUPANSKA B, GUZ K, ORZIŃSKA A, KALIŃKA A. Noninvasive determination of fetal *RHD* status by examination of cell-free DNA in maternal plasma. **Transfusion**, 45: 1473-80, 2005.
- CASTILHO L, PELLEGRINO Jr J. Blood group genotyping. **Rev Bras Hematol Hemoter**, 26(2):135-40, 2004.
- COSTA JM, GIOVANGRANDI Y, ERNAULT P, LOHMANN L, NATAF V, HALALI NE *et al.* Fetal *RHD* genotyping in maternal serum during the first trimester of pregnancy. **Br J Haematol**, 119:255-60, 2002.
- CHOU ST, WESTHOFF CM, Molecular biology of the Rh system: clinical considerations for transfusion in sickle cell disease. **Hematology**, 2009:178-84, 2009.
- DANIELS G, FINNING K, MARTIN P, SOOTHILL P. Fetal blood group genotyping from DNA from maternal plasma: an important advance in the management

- and prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn. **Vox Sanguinis**, 87(4):225-32, 2004.
- DANIELS G, FINNING K, MARTIN P, SUMMERS J. Fetal blood group genotyping: present and future. **Ann NY Acad Sci**, 1075:88-95, 2006.
- DANIELS G, FINNING K, MARTIN P, MASSEY E. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal blood group phenotypes: current practice and future prospects. **Prenat Diagn** 29:101-7, 2009a.
- DANIELS G, van der SCHOOT CE, GASSNER C, OLSSON ML. Report of the third international workshop on molecular blood group genotyping. **Vox Sanguinis**, 96:337-43, 2009b.
- DANIELS G, CASTILHO L, FLEGEL WA, FLETCHER A, GARRATTY G, LEVENE C, *et al.* International Society of Blood Transfusion working party on terminology for red cell surface antigens. Macao report. **Vox Sanguinis**, 96:153-6, 2009c.
- DENOMME GA, DAKE LR, LILENSKY D, RAMYAR L, JUDD WJ. Rh discrepancies caused by variable reactivity of partial and weak D types with different serologic techniques. **Transfusion**; 48:473-8, 2008.
- FAAS BHW, BEULING EA, CHRISTIAENS GCML, von dem BORNE AEGK, van der SCHOOT, CE. Detection of fetal *RHD*-specific sequence in maternal plasma. **Lancet**, 352(9135):1196, 1998.
- FINNING KM, MARTIN PG, SOOTHILL PW, AVENT ND. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal *RHD* genotyping service. **Transfusion**, 42: 1079-85, 2002.
- FINNING K, MARTIN P, DANIELS G. A clinical service in the UK to predict fetal Rh (Rhesus) D blood group using free fetal DNA in maternal plasma. **Ann NY Acad Sci**, 1022:119-23, 2004.
- FINNING K, MARTIN P, SUMMERS J, MASSEY E, POOLE G, DANIELS G. Effect of high throughput *RHD* typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. **Br Med J**, 336 (7648):816-18, 2008.
- FINNING K, MARTIN P, DANIELS G. The use of maternal plasma for prenatal RhD blood group genotyping. **Methods Mol Biol**, 496:143-57, 2009.
- FLEGEL WA, WAGNER FF. Molecular biology of partial D and weak D: Implications for blood bank practice. **Clin. Lab.**; 48: 53-9, 2002.
- FLEGEL WA, The genetics of the Rhesus blood group system. **Blood Transfus**, 5:50-7, 2007.

- FLEGEL WA, von ZABERN I, DOESCHER A, WAGNER FF, STRATHMANN KP, GEISEN C *et al.* D variants at the RhD vestibule in the weak D type 4 and Eurasian clusters. **Transfusion**; 49:1059-69, 2009.
- GIRELO AL, KUHN TIBB. Doença hemolítica perinatal In: GIRELO AL, KUHN TIBB. Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária. São Paulo: **Editora SENAC São Paulo**; 2002. p145-63
- FLETCHER RH, FLETCHER SW. Diagnóstico. In FLETCHER RH, FLETCHER SW. Epidemiologia Clínica: Elementos Essenciais. 4ª Ed. Porto Alegre: **Artmed**; 2006. p. 56-81
- HARPER TC, FINNING KM, MARTIN P, MOISE Jr KJ. Use of maternal plasma for noninvasive determination of fetal RhD status. **Am J Obstet Gynecol**, 191:1730-2, 2004.
- HOWARD HL, MARTLEW VJ, MCFADYEN IR, CLARKE CA. Preventing Rhesus D haemolytic disease of the newborn by giving anti-D immunoglobulin: are the guidelines being adequately followed? **Br J Obstet Gynaecol**, 104:37-41, 1997.
- HROMADNIKOVA I, VECHETOVA L, VESELA K, BENESOVA B, DOUCHA J, VLK R. Non-invasive fetal *RHD* and RHCE genotyping using real-time PCR testing of maternal plasma in RhD-negative pregnancies. **J Histochem Cytochem**, 53(3): 301-5, 2005
- JOHNSON L, McCracken SA, MORRIS JM, WOODLAND NB, FLOWWER RL. Variation in the reliability of *RHD* antenatal genotyping using the polymerase chain reaction and targeting multiple exon of the *RHD* gene. **Vox Sanguinis**, 85:222-223, 2003.
- KENNEDY MS, WAHEED, Doença hemolítica do recém-nascido e do feto. In: HARMENING D. Técnicas modernas em banco de sangue e transfusão. 4ª edição. Rio de Janeiro: **Livraria e editora Revinter LTDA**, 2006. p. 421-35.
- LAMBIN P, DEBBIA F, PUILLANDRE 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 TJ, LYNEN R, MAAS JH, PINDUR G, KULENKAMPFF D, SUREN A. Prediction of fetal RhD and RhCcEe phenotype from maternal plasma with real-time polymerase chain reaction. **Transfus Apher Sci**, 27:217-3, 2002.
- LO YMD, CORBETTA N, CHAMBERLAIN PF, RAI V, SARGENT IL, REDMAN, CWG. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. **Lancet**, 350: 485-87, 1997.

- LO, YMD, TEIN MSC, PANG CCP, YEUNG CK, TONG KL, HJELM NM. Presence of donor-specific DNA in plasma of kidney and liver-transplant recipients. **Lancet**, 351:1329-30, 1998a.
- LO YMD, HJELM NM, FIDLER C, SARGENT IL, MURPHY MF, CHAMBERLAIN PF *et al.* Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. **N Engl J Med**, 339: 1734-8, 1998b.
- LO YMD. Fetal DNA in maternal plasma: application to non-invasive blood group genotyping of the fetus. **Transfus Clin Biol**, 8: 306-10, 2001.
- LO YMD. Recent developments in fetal nucleic acids in maternal plasma: implications to noninvasive prenatal fetal blood group genotyping. **Transfus Clin Biol**, 13: 50–52, 2006.
- MAASKANT-VAN WIJK PA, FAAS BHW, RUIJTER JAM, OVERBEEKE MAM, von dem BORNE AEGKr, van RHENEN DJ *et al.* Genotyping of *RHD* by multiplex polymerase chain reaction analysis of six *RHD*-specific exons. **Transfusion**, 38: 1015-21, 1998.
- MACHADO IN. Genotipagem *RHD* fetal através da análise do plasma materno [Dissertação]. Campinas (SP): **Universidade Estadual de Campinas**; 2004.
- MACHADO IN, BARINI R, SANTOS CM, SIMONI RZ, MILANEZ H, PINTO E SILVA JL. Maternal antecedents and outcomes for RhD allo-immunization: a study of a brazilian population. **Rev Ciênc Méd**, 14(3):273-7, 2005.
- MACHADO, IN, BARINI R. Doença hemolítica perinatal: aspectos atuais. **Rev Ciênc Méd**, 15(1):69-74, 2006.
- MACHADO, IN, CASTILHO L, PELEGRINO Jr J, BARINI R. Fetal RhD genotyping from maternal plasma in a population with a highly diverse ethnic background. **Rev Assoc Med Bras**, 52(4):232-5, 2006.
- MINON JM, SENTERRE JM, SCHAAPS JP, FOLDART JM. An unusual false-positive fetal *RHD* typing result using DNA derived from maternal plasma from solid organ transplant recipient. **Transfusion**, 46:1454, 2006.
- MINON JM, GERARD C, SENTERRE JM, SCHAAPS JP, FOIDART JM. Routine fetal *RHD* genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium. **Transfusion**, 48:373-81, 2008.
- MIURA C, SARAIVA P. Reações antígeno-anticorpo *in vitro*. In: SCROFERNEKER ML. Imunologia básica e aplicada. Porto Alegre: **Editores Sagra Luzzato**, 1998. p.238-65

- MIURA E, DREBES S. Hiperbilirrubinemia no recém-nascido. In: MIURA E. Neonatologia: princípios e prática. Porto Alegre: **Artes Médicas**, 1991. p.131-44
- MOISE Jr KJ. Management of red cell alloimmunization in pregnancy. In: SACHER RA & BRECHER ME (ed.). Obstetric transfusion practice. Bethesda: **American Association of Blood Banks**, 1993. p. 21-47
- MOISE Jr KJ. Fetal *RHD* typing with free DNA in maternal plasma. **Am J Obstet Gynecol**, 192: 663-5, 2005
- MOISE Jr KJ. Management of Rhesus alloimmunization in pregnancy. *Obstetrics & Gynecology*, 112:164-175, 2008.
- MOLLISON PLA, ENGELFRIET CP, CONTRERAS M. Blood transfusion in Clinical Medicine. 9th edition. Oxford: **Blackwell Scientific Publications**, 1993. 1015p.
- MÜLLER TH, WAGNER FF, TROCKENBACHER A, EICHER NI, FLEGEL WA, SCHÖNITZER D *et al.* PCR screening for common weak D types shows different distributions in three Central European populations. **Transfusion**, 41:45-52, 2001.
- MÜLLER SP, BARTELS I, STEIN W, EMONS G, GUTENSOHN K, KÖHLER M *et al.* The determination of the fetal D status from maternal plasma for decision making on Rh prophylaxis is feasible. **Transfusion**, 48: 2292-301, 2008.
- MURRAY NA, ROBERTS IAG. Haemolytic disease of the newborn. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**, 92:83-8, 2007.
- NARDOZZA LMM, PARES DBS. Aloimunização pelo fator RH. In: MORON, AF. Medicina fetal na prática obstétrica. São Paulo: **Livraria Santos Editora LTDA**, 2003. p. 223-6
- NELSON M, EAGLE C, LANGSHAW M, POPP H, KRONENBERG H. Genotyping fetal DNA by non-invasive means: extration from maternal plasma. **Vox Sanguinis**, 80:112-6, 2001.
- NICOLAIDES KH, RODECK CH, MIBASHAN RS, KEMP JR. Have Liley charts outlived their usefulness? **Am J Obstet Gynecol**, 155:90-94, 1986.
- POLIN H, DANZER M, HOFER K, GASSNER W, ST-LOUIS M, PROLL J *et al.* Identification of *RHD* alleles with the potential of anti-D immunization among seemingly D- blood donors in Upper Austria. **Transfusion**, 49:676-81, 2009.
- POON LLM, LEUNG TN, LAU TK, LO YMD. Presence of fetal RNA in maternal plasma. **Clin Chem**, 46(11):1832-4, 2000.

- RANDEN I, HAUGE R, KJELDTSEN-KRAGH J, FAGERHOL MK. Prenatal genotyping of *RHD* and *SRY* using maternal blood. **Vox Sanguinis**, 85, 300-6, 2003.
- RIJNDERS RJP, CHRISTIAENS GCML, BOSSERS B, SMAGT JJ, SCHOOT E *et al.* Clinical applications of cell-free fetal DNA from maternal plasma. **Am J Obstet Gynecol**, 103:157-164, 2004.
- RODECK CH, WHITTLE MJ. Aloimunização das células vermelhas. In: RODECK CH, WHITTLE MJ. Medicina fetal: Fundamentos e prática clínica. Rio de Janeiro: **Livraria e editora Revinter LTDA**, 2005. p. 785-804.
- RODRIGUES A, RIOS M, PELLEGRINO Jr J, COSTA FF, CASTILHO L. Presence of the *RHD* pseudogene and the hybrid *RHD-CE-D^s* gene in Brazilians with the D-negative phenotype. **Braz J Med Biol Res**, 35:767-773, 2002.
- RODRIGUES A. Caracterização molecular dos antígenos RhD (RhD fraco e RhD parcial) e suas aplicação na prática transfusional [Tese de Doutorado]. Campinas (SP): **Universidade Estadual de Campinas**; 2005.
- ROSA RS, GUIMARÃES JF, SALUM Jr GA. Bioestatística e Epidemiologia Clínica. In: STEFANI SD, BARROS E, editores. Clínica Médica: Consulta Rápida. 3ª ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2008. p41-57
- SINGLETON BK, GREEN CA, AVENT ND, MARTIN PG, 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(1):12-8, 2000.
- SIVA SC, JOHNSON SI, McCracken SA, MORRIS JM. Evaluation of the clinical usefulness of isolation of fetal DNA from the maternal circulation. **Aust N Z J Obstet Gynaecol**, 43: 105, 2003.
- SWEENEY JD; RIZK Y. Manual prático de hemoterapia Rio de Janeiro: **Livraria e Editora Revinter LTDA**; 2005. p. 91-8.
- URBANIAC SJ. Consensus conference on anti-D prophylaxis, April 7 and 8, 1997: final consensus statement. Royal College of Physicians of Edinburg/Royal College of obstetrician and Gynecologists. **Transfusion**, 38:97-9, 1998.
- van der SCHOOT CE, HAHN S, CHITTY LS. Non-invasive prenatal diagnosis and determination of fetal Rh status. **Semin Fetal Neonatal Med**, 13:63-8, 2008.
- WAGNER F, FLEGEL W. *RHD* gene deletion occurred in the Rhesus box. **Blood**, 95(12):3662-8, 2000.
- WESTHOFF CM. The Rh blood group system in review: A new face for the next decade. **Transfusion**, 44:1663-73, 2004.

- ZHANG J, FIDLER C, MURPHY MF, CHAMBERLAIN PF, SARGENT IL, REDMAN CWG *et al.* Determination of fetal RhD status by maternal plasma DNA analysis. **Ann NY Acad Sci**, 906:153-5, 2000.
- ZHONG XY, 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.
- ZHOU L, THORSON JA, NUGENT C, DAVENPORT RD, BUTCH SH, JUDD WJ. Noninvasive prenatal *RHD* genotyping by real-time polymerase chain reaction using plasma from D-negative pregnant women. **Am J Obstet Gynecol** 193:166-71, 2005.

8. APÊNDICE

Documento 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: Determinação do genótipo *RHD* fetal através do plasma materno pela técnica de PCR em tempo real. Pesquisadora: Responsável Daphne Amaral

Eu, _____, _____ anos, RG _____, aceito colaborar como voluntária com este estudo que vai tentar descobrir o tipo de sangue do meu bebê ainda dentro do meu útero através de um exame do meu sangue. Os resultados deste estudo poderão ajudar no acompanhamento pré-natal de grávidas com o tipo de sangue “negativo”, como o meu, através da prevenção da doença hemolítica do recém-nascido.

Fui informada que este exame de sangue não será prejudicial para mim e para o meu bebê, e também não me trará benefício imediato. Também estou ciente que não vai haver nenhuma forma de reembolso de dinheiro, já que eu não terei nenhum gasto com a participação na pesquisa. Caso eu não queira participar ou desista após ter concordado em participar, isso não prejudicará meu atendimento atual ou futuro na UNICAMP.

Para participar, terei que doar cerca de 10ml 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 como em qualquer coleta de sangue rotineira. A coleta está prevista para uma única vez. Este estudo não apresentará nenhum outro risco importante a mim. O sangue será coletado com agulhas e seringas estéreis e descartáveis e com o uso de luvas descartáveis. O material colhido neste estudo será utilizado somente para os objetivos propostos. Terei também que responder algumas perguntas, mas estou ciente que as informações obtidas pelo estudo terão um caráter sigiloso e confidencial e serão usadas apenas com a finalidade de divulgação e publicação científica, e minha identidade será sempre preservada. Os responsáveis pela pesquisa garantem que o meu material genético e os dados coletados não serão utilizados em qualquer outro projeto de pesquisa bem como que todo material biológico obtido será descartado ao final do estudo.

O benefício esperado com a minha participação seria a minha contribuição para melhorar a identificação do tipo sanguíneo do bebê e conseqüentemente um tratamento mais eficaz para a doença hemolítica do recém-nascido.

Tenho direito a solicitar esclarecimentos sobre a pesquisa em qualquer momento, contatando a pesquisadora Daphne pessoalmente Laboratório de Pesquisa em Hemoterapia (HEMOCENTRO - UNICAMP), por e-mail (daphnerta@gmail.com) ou ainda pelos telefones (19) 3521-8750 e 8819-3898. Poderei também contatar o Comitê em Pesquisa da Unicamp pelo telefone (19) 3521-8936, por e-mail (cep@fcm.unicamp.br) ou pessoalmente no endereço (Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 - Campinas - SP - Brasil - CEP: 13083 -887). Declaro que concordo plenamente com os termos acima e que estou recebendo uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido na presente data.

Campinas, _____ de _____ de _____.

Paciente

Daphne Renata Tavares Amaral
Pesquisadora

Documento 2

PROTOCOLO DE IDENTIFICAÇÃO

Determinação do genótipo *RHD* fetal através do plasma materno pela técnica de PCR em tempo real

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Faculdade de Ciências Médicas – FCM

Orientadora: Dra. Lílian Castilho

Pesquisadora responsável: Daphne Renata Tavares Amaral

Nº: _____

Paciente: _____ HC: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Idade: _____ anos

Endereço para contato: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____

Telefones para contato: _____

Marido/ Pai: _____

G ____ P ____ A ____ Data do último parto: ____/____/____

Transusão: () Não () Sim ____/____/____

Tipagem sanguínea da paciente: ____ Rh Neg PAI: () Neg () Pos () NR

Tipagem sanguínea do marido: ____ Rh () Pos () Neg () Desconhecida

Sexo fetal: () Masculino () Feminino () Desconhecido

DUM: ____/____/____ Confiável () Sim () Não

Ecografia _____ Gestação () Tópica () Única

Data da coleta: ____/____/____ : ____ DPP ____/____/____

Idade gestacional: ____ semanas Centrifugação: ____:

Término da Gestação: ____/____/____ () Parto () Aborto

Idade gestacional: ____ semanas

Sexo fetal: () Masculino () Feminino

Tipagem do neonato: ____ Rh () Pos () Neg () Desconhecida

FETAL *RHD* GENOTYPING BY ANALYSIS OF MATERNAL PLASMA IN A MIXED POPULATION

Daphne R T Amaral, Débora C Credidio, Jordão Pellegrino Junior, Lilian Castilho

Hemocentro- UNICAMP- Campinas, SP, Brazil

Correspondence to: Lilian Castilho, PhD, Hemocentro, Unicamp
Rua Carlos Chagas, 480, Caixa Postal 6198, CEP 13081-970, Campinas, SP,
Brazil. Telephone: (55 19) 3521-8749 Fax: (55 19) 3521-8600 e-mail:
castilho@unicamp.br

ABSTRACT

Background: 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. We assessed the accuracy of fetal *RHD* genotyping by analysis of maternal plasma in a multi-ethnic population. **Methods:** We analyzed plasma samples from 88 RhD-negative pregnant women between 11 and 39 weeks of gestation, median age of 28 years old to determine the fetal *RHD* genotype. This population was from Southeastern Brazil with high mixed ethnic background. Fourteen patients (16%) had anti-D alloantibody. We used Taqman primers and probes to detect by real-time PCR, exons 4, 5 and 10 of *RHD*. As internal controls we used primers/probes sets to *SRY* and *CCR5*. Peripheral or umbilical cord bloods from respective neonates were collected during delivery and hemagglutination was performed. **Results:** Fifty-eight samples (66%) were genotyped as *RHD*⁺, twenty-seven samples (31%) showed completely absence of *RHD* and 3 samples (3 %) presented a D variant (*RHD*_v). All the results agreed with the neonatal typing including the 3 fetuses with the *RHD*_v, phenotyped as RhD-negative. Thus, the accuracy of the fetal *RHD* genotyping in this mixed population was 100%. The earliest pregnancy in which fetal *RHD* was detected was 11 weeks. **Conclusion:** Our findings indicate that the accuracy of *RHD* gene using 3 regions (exons 4, 5 and 10) can be sufficient for clinical application in a multi-ethnic population. This knowledge helped us on the development of a feasible protocol for fetal *RHD* genotyping on DNA from maternal plasma for our population.

Short Title: Fetal *RHD* genotyping in a mixed population

This study was financially supported by Fapesp grants nº 2007/07151-3 and 2009/05924-0 and CNPq, Brazil. The Hematology and Hemotherapy Center - Hemocentro UNICAMP, forms part of the National Institute of Science and Technology of Blood, Brazil (INCT do Sangue –CNPq / MCT / FAPESP).

Introduction

Hemolytic Disease of the Fetus and the Newborn (HDFN) still contributes to perinatal morbidity and mortality, in spite of the widespread immunoprophylaxis (Machado *et al*, 2006). 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 (Murray *et al*, 2007). 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 (Muller *et al*, 2008).

It is beneficial to know the fetal RhD phenotype of pregnant women with anti-D. If the fetus is RhD-negative, then it is not at risk from HDFN and no invasive procedures are required; if it is RhD-positive, the appropriate

management of a pregnancy at risk can be arranged (Daniels *et al*, 2006)

However, traditional procedures for obtaining fetal samples (amniocentesis and cordocentesis) are expensive, invasive and present a risk to the fetus with fetal losses estimated at 1-15%. Furthermore, these procedures may aggravate the disease (Lo *et al*, 1998; Costa *et al*, 2002; Machado, 2004; Daniels, 2006). The discovery of free fetal DNA in maternal plasma coupled with the use of molecular biology techniques has made noninvasive fetal *RHD* genotyping possible (Lo *et al*, 1998, Daniels *et al*, 2006, Finning *et al.*, 2002, 2004, 2008)). Currently, maternal plasma analysis for determination of the fetal *RHD* status became an exciting new tool for the management of RhD-negative pregnant women, specially sensitized women. In addition, a simple, noninvasive fetal *RHD* typing would reduce wastage of anti-RhD Ig, making the test cost-effective (Daniels, 2004; Machado, 2006).

Fetal *RHD* genotyping by conventional PCR can be easily performed in any basic molecular laboratory (Faas *et al*, 1998; Nelson *et al*, 2001; Johnson *et al*, 2003; Siva *et al*, 2003; Machado *et al*, 2006). However, it has been demonstrated that real-time PCR assays can provide more accurate results in a quick and non-demanding way (Lo *et al*, 1998; Zhang *et al*, 2000; Zhong *et al*, 2001; Costa *et al*, 2002; Legler *et al.*, 2002; Turner *et al*, 2003; Finning *et al*, 2004; Rijnders *et al*, 2004; Zhou *et al*, 2005; Daniels *et al*, 2006).

There are, however, several challenges in fetal *RHD* genotyping. A major problem is the presence of *RHD* variants, in special, the presence of the *RHD* pseudogene (*RHD* Ψ) and the *RHD-CE-Ds* hybrid gene in Africans with an RhD-negative phenotype (Singleton *et al*, 2000). Minon *et al*, 2008 related, in an African population, that 44% of the population had the *RHD* pseudogene and 22% the hybrid gene *RHD-CE-D^s*. In Brazilians, Rodrigues *et al*, 2002 reported the presence of the *RHD* pseudogene in 11% and the *RHD-CE-D^s* in 2% of the population phenotyped as RhD negative. Although amplification of a single region of *RHD*

can provide a correct phenotype prediction in the majority of the cases, most protocols involve amplification of two or three exons to avoid obtaining false results with the more common variants of *RHD*. It is important that false positives do not result from the presence of the inactive African genes *RHD* Ψ and *RHD-CE-D^s* (Finning *et al*, 2002; Daniels *et*, 2004; Rijnders *et al*, 2004).

Most of molecular protocols developed were based on sequences of individuals of Caucasian origin. It is known that there are different genetic causes for RhD-negative phenotype of an individual with an incidence that varies according to the ethnic origin. The Brazilian population is of heterogeneous ethnical origin and it is unevenly distributed within this country of continental dimensions. The intense process of miscegenation made the Brazilian population unique in its ethnic background without any clear distinction of race in the country (Pellegrino Jr. *et al*, 2001; Machado *et al*, 2006).

For these reasons, we conducted a study to evaluate the clinical application of fetal *RHD* genotyping from maternal plasma using real-time PCR and primers and probes targeted toward *RHD* (exons 4, 5 and 10), by assessing its accuracy, in a multi-ethnic Brazilian population.

Material and methods

Subjects

Ten milliliters of maternal peripheral blood were obtained from 88 RhD-negative pregnant women with singleton pregnancies and maternal age from 18 to 46 years (median 28 years) who agreed to participate in this study by signing an IRB approved informed consent during a routine prenatal visit. The gestational age at the time of blood collection ranged from 11-39 weeks (median: 27 weeks). Two (2,27%) samples were from first trimester, 45 (51,13%) from second and 41 (46,60%) from third trimester of gestation. The pregnant women were from the Southeastern Brazil with high mixed ethnic background, and admixture between descendants of Europeans, Africans

and Native Americans. Fourteen patients (16%) had anti-D in the serum.

Preparation of samples

Blood samples were collected into EDTA-containing tubes and centrifuged at 4.000 rpm for 10 minutes, with less than two hours after collection. Maternal plasma was removed to a fresh tube without disturb buffy coat. Aliquots of plasma were then centrifuged at 13.000 rpm for a further 20 minutes. The supernatant was removed to a fresh tube and stored at -20°C until required. Maternal buffy coat was removed to a fresh tube to obtain maternal DNA, respectively. One plasma aliquot of each sample was thawed at room temperature and centrifuged again at 13.000 rpm for 10 minutes to isolate cryoprecipitate.

DNA extraction

Fetal DNA was extracted from 800uL of plasma supernatant using the QIAmp Blood DNA Mini Kit (Qiagen, Chattersworth, USA) according to the manufacturer's instructions. Fetal DNA was eluted in 55 uL of nuclease-free water. DNA concentration was measured by spectrophotometry (Nanodrop, Wilmington, USA).

Real-time PCR analysis

Real-time PCR analysis was performed using a sequence detector Rotor Gene 6.000 5-plex (Qiagen, Chattersworth, USA). TaqMan primers and probes used for fetal *RHD* genotyping were targeted towards exons 4, 5 and 10 of *RHD*. The primers for exons 4 and 5 were designed to amplify only the *RHD* gene and not *RHD Ψ* while the primers for exon 10 were designed to amplify both genes. As internal controls we used primers/probes sets to *SRY* and *CCR5*. All primers and probes sequences used were previously described (Finning *et al*, 2009). The Real-time PCR was performed in accordance with a previously described protocol (Finning *et al*, 2009) and is briefly described below.

TaqMan amplification reactions were set up in a reaction volume of 15 μ L using the TaqMan Universal PCR master Mix (Applied

Biosystems). Primers and probes were optimized to determine the minimum prime and probe concentrations that give the minimum cycle threshold (Ct) values. The *RHD* exon 4 and *CCR5* primers were used at final concentration of 300 nM while *RHD* exons 5 and 10 and *SRY* were used at final concentration of 150 nM. The *RHD* exons 4, 5 and 10 and *CCR5* probes were used at final concentration of 50 nM while *SRY* was used at final concentration of 100 nM. The TaqMan PCR conditions used were 50°C for 2 minutes, 95°C for 10 minutes, then 50 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. Each sample was analyzed in three replicate for each *RHD* exon and for *SRY* and in two replicate for *CCR5*.

Amplification plots of each *RHD* exon, *SRY*, and *CCR5* for patient samples were checked. The fetus was predicted to be RhD-positive if at least 2/3 replicates for *RHD* exons 4, 5 and 10 were positive (Ct value <42), with an additional two positive replicates from any of the *RHD* exons. If, the difference between any Ct value for *RHD* exon 10 and *CCR5* was less than 2, this could indicate that the mother has an unexpressed *RHD* gene and the test result was considered unreliable and further investigation was carried out using the maternal genomic DNA. The fetus was predicted to be D-negative if no replicates, or only 1/9 replicates, was positive. If the fetus was predicted to be D-negative, the *SRY* result was used to confirm the presence of fetal DNA if the fetus was male. In these cases, the presence of fetal DNA was confirmed when at least 2/3 replicates were positive. If *RHD* exon 10 replicates were positive, but exons 4 and 5 were negative, this could indicate that the fetus had a D-variant *RHD* gene (*RHD Ψ* or the hybrid *RHD-CE-Ds* gene) and we interpreted as RhD-negative.

Confirmation of the fetal D status and sex

Peripheral or umbilical cord bloods from respective neonates were collected at birth and hemagglutination was performed. Information of the neonate's sex was also obtained at birth.

Results

Fetal *RHD* genotyping

We analyzed plasma samples of 88 pregnant women and correlated the results with the serological analysis of peripheral or umbilical cord bloods from respective neonates at birth.

RHD positive fetuses were identified in 58 (65.9%) samples and *RHD* negative in 27 (30.7%) samples. Three (3.4%) samples showed amplification for *RHD* Exon 10 and *CCR5* only (Table 1). These assays were repeated several times and showed the same results. These results could indicate the presence of *RHD* variants as *RHD* Ψ or the hybrid *RHD-CE-Ds* gene and therefore the fetuses were classified as RhD-negative. Of the 58 *RHD* positive fetuses there was 1 in the first trimester, 29 in the second trimester and 28 in the third trimester. Of the 27 *RHD* negative fetuses there was 1 in the first trimester, 16 in the second trimester and 13 in the third trimester. Two *RHD* variants were detected in the second trimester and 1, in the third trimester (Table 1).

Among the 30 fetuses classified as RhD-negative (27 *RHD*-deletion and 3 *RHD*-variants) the *SRY* gene was identified in 11 (36.7%) confirming the presence of fetal DNA. In the 19 RhD-negative samples remaining only the *CCR5* gene was detected confirming the successful of DNA extraction but not the presence of fetal DNA.

Fetal *SRY* genotyping

All the 88 DNA samples from maternal plasma were tested for *SRY*. Interestingly, the *SRY* was positive in 44 samples and negative in 44 samples. Thirty-three fetuses predicted to be RhD-positive and 11 predicted to be RhD-negative were also predicted to be male. (Table 1).

Accuracy of fetal *RHD* and *SRY* genotyping

An accuracy rate, sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of 100 percent was achieved in the prediction of fetal D status and fetal sex, when results were compared with serologic tests on infant's RBCs

and sex information. Those three samples genotyped as *RHD* variant, and predicted to be RhD-negative, were confirmed to be RhD-negative by serology.

Table 1: *RHD* and sex genotyping in 88 pregnancies using maternal plasma as a source of fetal DNA, stratified by gestational age

Gestational age (weeks)	N	<i>RHD</i> +		<i>RHD</i> -		Accuracy
		Male	Fem	Male	Fem	
11-12	2	0	1	1	0	100%
13-27	45	16	13	4	12 ^a	100%
28-39	41	17	11	6	7 ^B	100%
Total	88	33	25	11	19	100%

α and β : Two samples and one sample respectively that showed amplification only for *RHD* Exon 10 and *CCR5* and were predicted to be RhD-negative

Discussion

The discovery of fetal free DNA in maternal plasma has opened new possibilities for the determination of blood groups for prenatal non-invasive procedures (Lo *et al*, 1998; Daniels *et al*, 2006). Knowledge of *RHD* fetal genotype is very important for medical management of RhD negative pregnant women mainly in a risk of occurrence of HDFN. It allows the identification of fetuses at risk for HDFN and also the identification of risk pregnancies, intensifying prenatal care for these groups. Many researchers have concentrated efforts in the investigation of a methodology for determining fetal *RHD* genotype using fetal DNA isolated from maternal blood. This prospective study demonstrated that the real-time PCR analysis of maternal plasma can be used for fetal *RHD* genotyping, even in a multiethnic population.

For high sensitivity and specificity (close to 100%), the methodology requires a number of criteria and controls. The use of probes methodology is necessary once the fetal DNA in maternal plasma is found in low concentrations and highly degraded. The real-time PCR technique is labor intensive and requires extensive standardization to obtain reliable results. Thus, the establishment of

optimal conditions of reaction is of great importance.

Due to high homology and complexity of the *RHD* gene, there is a general agreement that primers and probes must be carefully designed and should be analyzed at least two gene regions (Brojer *et al*, 2005; Hromadnikova *et al*, 2005). To consider a positive *RHD* genotyping result it is necessary that all *RHD* exons show amplifications. This minimizes the occurrence of false results and enables the identification of possible *RHD* variants. With the aim of improving accuracy of results, it is recommended that the amplification be performed at least in triplicate for each *RHD* region studied and that positive and negative controls be included. Due to implementation of all these criteria in the protocol, this study obtained satisfactory results and concordance rate of 100% when comparing results from genotyping and serology tests performed on the neonates RBCs at birth.

There is no consensus about which *RHD* regions should be used in fetal genotyping. *RHD* Ψ contains several single nucleotide polymorphisms (SNPs) in exons 4 and 5 and a negative result can be achieved by the use of primers or probes specific for the active sequence (Singleton *et al*, 2000, Finning *et al*, 2002). Amplification of any *RHD* sequence within exons 4-7 will give a correct negative result with *RHD-CE-Ds*. Where possible, *RHD* genes producing variant RhD antigens should give a positive result and this can be achieved by including an amplification of exon 7 or 10 (Daniels *et al*, 2008). Exons 4, 5, 6, 7 and 10 are the *RHD* regions most used. In this study, we decided to analyze exons 4, 5 and 10 and found 3 samples that showed amplification only for *RHD* Exon 10 and *CCR5*. This strategy allowed us to identify 3 fetuses with *RHD* variants, further investigated at birth and identified as *RHD* Ψ . These findings strongly suggest that in multiethnic populations it is essential to include analysis of *RHD* Ψ in order to avoid false positive results.

In this study we also had satisfactory results with the fetal sex with 100% of concordance, although we had used the *SRY* as an internal

control of the presence of fetal DNA. Eleven fetuses predicted to be RhD-negative were also predicted to be male. However, in 19 maternal blood samples analyzed, no *RHD* or *SRY* signal was detected. Although it was confirmed that these fetuses were D-negative females, it cannot be ascertained that fetal DNA was present in these maternal plasma samples. The earliest pregnancy in which the presence of fetal DNA was confirmed in our study was 11 weeks.

Successful *RHD* genotyping was achieved despite the presence of maternal anti-D in 16 percent of the pregnant women studied. Our results indicate that fetal *RHD* genotyping can be performed with a high degree of accuracy when using maternal plasma as a source of DNA, despite of maternal anti-D. In conclusion, noninvasive fetal *RHD* genotyping by targeting exons 4, 5 and 10 with real-time PCR is highly sensitive and accurate in a mixed population and can be sufficient for clinical application.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Daiane Costa, Karina Ribeiro, Dulcinéia Albuquerque, Lúcia Helena de Siqueira, Fernanda A. Moretto, Maria de Fátima Locatelli, Andréia Origa, João Luiz Fadiga and Marcela from Hemocentro-Unicamp for technical assistance. We also thank Veridiana and Patrícia from Applied Biosystems and Qiagen respectively, for technical assistance. We are also grateful to the staff at the Obstetrics Unit, CAISM, Unicamp, for obtaining maternal blood samples.

REFERENCES

- Brojer E, Zupanska B, Guz K, Orzinska A, Kalinka A. 2005. Noninvasive determination of fetal *RHD* status by examination of cell-free DNA in maternal plasma. *Transfusion* **45**: 1473-1480.
- Costa JM, Giovangrandi Y, Ernaul P, Lohmann L, Nataf V, Halali NE, Gautier E. 2002 Fetal *RHD* genotyping in maternal serum during the first trimester of pregnancy. *Br J Haematol* **119**:255-60.
- Daniels G, Finning K, Martin P, Soothill P. 2004. Fetal blood group genotyping from DNA from maternal plasma: an important advance in the management and prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn. *Vox Sanguinis* **87**: 225-232.
- Daniels G, Finning K, Martin P, Summers J. 2006. Fetal blood group genotyping: present and future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1075**:88-95.
- Daniels G, Finning K, Martin P, Massey E. 2009. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal blood group

- phenotypes: current practice and future prospects. *Prenatal Diagn* **29**: 101-107
- Faas BHW, Beuling EA, Christiaens GCML, Von Dem Borne AEGK, Van Der Schoot CE. 1998. Detection of fetal *RHD*-specific sequence 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.
- Finning K, Martin P, Daniels G. A clinical service in the UK to predict fetal Rh (Rhesus) D blood group using free fetal DNA in maternal plasma. 2004. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1022**:119-123.
- Finning K; Martin P, Summers J, Massey E, Poole J, Daniels G. 2008. Effect of high throughput *RHD* typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *BMJ*, **336**:816-818.
- Finning K, Martin P, Daniels G. 2009 The use of maternal plasma for prenatal RhD blood group genotyping. *Methods in molecular biology*, **496**:143-157.
- Hromadnikova I, Vechetova L, Vesela K, Benesova B, Doucha J, Vlk R. 2005. Non-invasive fetal *RHD* and RHCE genotyping using real-time PCR testing of maternal plasma in RhD-negative pregnancies. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **53**: 301-305.
- Johnson L, Mccracken SA, Morris JM, Woodland NB, Flower R L. 2003. Variation in the reliability of *RHD* antenatal genotyping using the polymerase chain reaction and targeting multiple exon of the *RHD* gene. *Vox Sang*, **85**: 222-223.
- Legler TJ, Lynen R, Maas J H, Pindur G, Kulenkampff D, Suren A. 2002. Prediction of fetal RhD and RhCE phenotype from maternal plasma with real-time polymerase chain reaction. *Transfus. Apheresis Sci*, **27**: 217-223.
- Lo YMD, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, Poon PMK, Redman CWG, Wainscoat JS. 1998. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *NEJM* **339**: 1734-8.
- Machado IN, Castilho L, Pellegrino Jr J, Barini R. 2006. Fetal RhD genotyping from maternal plasma in a population with a highly diverse ethnic background. *Rev Assoc Med Bras* **52**:232-5.
- Minon JM, Senterre JM, Schaaps JP, Foldart JM. 2006. An unusual false-positive fetal *RHD* typing result using DNA derived from maternal plasma from solid organ transplant recipient. *Transfusion* **46**: 1454-5.
- Müller SP, Bartels I, Stein W, Emons G, Gutensohn K, Köhler M, Legler T J. 2008. The determination of the fetal D status from maternal plasma for decision making on RH prophylaxis is feasible. *Transfusion* **48**: 2292-2301.
- Murray NA, Roberts IAG. 2007. Haemolytic disease of the newborn. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, **92**:83-88.
- 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.
- Pellegrino Jr J, Castilho L, Rios M, De Souza CA. Blood group genotyping in a population of highly diverse ancestry. 2001. *J Clin Lab Anal* **15**:08-13.
- Rijnders RJP, Christiaens GCML, Bossers B, Smagt JJ, van der Schoot E, Haas M. 2004. Clinical applications of cell-free fetal DNA from maternal plasma. *American College of Obst and Gynec*, **103**:157-164.
- Rodrigues A, Rios M, Pellegrino Jr J, Costa FF, Castilho L. 2002. Presence of the *RHD* pseudogene and the hybrid *RHD-CE-D^s* gene in Brazilians with the D-negative phenotype. *Brazilian Journ of Med and Biol Research* **35**:767-773.
- Singleton BK, Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E, Daka A, Narter-Olaga EG, Hawthorne L ME, Daniels G. 2000. The presence of an *RHD* pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood*, **95**:12-18.
- Siva SC, Johnson SI, Mccracken SA, Morris JM. 2003. Evaluation of the clinical usefulness of isolation of fetal DNA from the maternal circulation. *Aust. NZJ Obstet Gynaecol*, **43**: 105.
- Turner MJ, Martin CM, O'leary JJ. 2003. Detection of fetal Rhesus D gene in whole blood of women booking for routine antenatal care. *Eur Jour Obst & Gyn and Reproductive Biology* **108**: 29-32.
- Zhang J, Fidler C, Murphy MF, Chamberlain PF, Sargent ILL, Redman CWG. 2000. Determination of fetal RhD status by maternal plasma DNA analysis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **906**: 153-5.
- Zhong X Y, 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 fetal DNA in maternal plasma. *Swiss Med Wkly* **131**:70-74.