

Diagnóstico no invasivo del Rh fetal en sangre materna en el primer trimestre de la gestación

¹Manzanares Galán S, ²Entrala Bernal C, ¹Sánchez Gila M, ²Fernández-Rosado F,
¹Cobo Aguilar D, ²Molina Molina L, ²Martínez Espín E, ¹Reche Casado R,
¹Pineda Lloréns A, ¹Gallo Vallejo JL
¹Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada.
²Lorgen GP, S.L. Business Innovation Center-BIC/CEEL. Armilla, Granada.
Dirección para correspondencia: sebastian.manzanares.galan@gmail.com



De izquierda a derecha y de arriba abajo: Esther Martínez, Francisco Fernández, Luis Molina, M.ª del Mar Sánchez, Alicia Pineda, Rosa Reche, José Luis Gallo, Carmen Entrala y Sebastián Manzanares.

Resumen

Introducción: El genotipado del antígeno RhD fetal en el ADN fetal libre en sangre materna podría ser una herramienta diagnóstica de utilidad para el protocolo de inmunoprofilaxis antenatal que se administra actualmente de rutina en muchos países, identificando aquellas gestantes portadoras de un feto Rh negativo, y por tanto sin riesgo de isoimmunización o enfermedad hemolítica perinatal. El objetivo de este trabajo es comprobar si esta prueba, realizada en el primer trimestre del embarazo, es suficientemente precisa para permitir su aplicación rutinaria en aras de reemplazar la inmunoprofilaxis habitual, así como estimar las dosis y el coste de las gammaglobulinas evitadas.

Metodología: Se realizó un estudio prospectivo durante el año 2011, estudiando el genotipo RhD en el plasma de 149 mujeres con Rh negativo no inmunizadas, con embarazo único, entre las semanas 8 y 13 de gestación. El ADN se extrajo inmediatamente tras la extracción de sangre y se determinó el genotipo fetal mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa dirigida a los exones 5 y 7 del gen del antígeno RhD. Se realizaron simultáneamente determinaciones del gen de la betaglobina y SRY del cromosoma Y (determinación del sexo fetal) para confirmar la presencia de ADN de origen fetal. Los resultados se compararon con el fenotipo Rh determinado en sangre de cordón tras el nacimiento, y se calcularon las discrepancias, la sensibilidad y la especificidad de la prueba.

Resultados: La concordancia del genotipo RhD fetal en plasma materno y el fenotipo fetal tras el parto fue del 98,2%, con un resultado falso positivo y un resultado falso negativo en las 115 muestras estudiadas. La especificidad del ensayo fue del 97,5% (intervalo de confianza del 95% [IC 95%] 87,1-99,9), la sensibilidad del 98,6% (IC 95% 92,7-99,9), y el 6,5% de los resultados fueron no concluyentes. La aplicación sistemática de este test ahorraría gammaglobulina anti-D innecesaria en el 34% (40/115) de las gestantes Rh negativas no sensibilizadas.

Conclusión: Este estudio prospectivo revela que la determinación del Rh fetal en ADN libre en plasma materno durante el primer trimestre de la gestación es factible y muy precisa, y permitiría pensar en reemplazar la inmunoprofilaxis universal a todas las gestantes Rh negativas, evitando hasta un 34% de las gammaglobulinas administradas.

Palabras clave: Genotipo Rh fetal; ADN fetal libre; reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real; Diagnóstico prenatal; Primer trimestre del embarazo.

Non-invasive fetal Rh status determination in early pregnancy

Abstract

Objective: To examine if non-invasive fetal RhD genotyping from maternal blood cell-free fetal DNA, performed in the first trimester of pregnancy, is accurate enough to purpose its routine application to replace usual immunoprophylaxis.

Study Design: Prospective study analyzing fetal RhD genotype in 149 nonimmunized RhD-negative single pregnancies, between 8 and 13 weeks of gestation. Fetal RhD genotype was detected by qPCR targeting exons 5 and 7. The results were compared with postnatal cord blood phenotype and discrepancy rates were calculated

Results: The concordance of fetal RhD genotypes in maternal plasma and newborn D-phenotypes at delivery was 98.2%, including one false-positive and one false-negative result. The specificity and sensitivity of the assay was 97.5% (95% CI 87.1-99.9) and 98.6% (95% CI 92.7-99.9) respectively, and 6.5% of the results were inconclusive. The application of this test in early pregnancy would avoid unnecessary antenatal prophylaxis in about 34% (40/115) of nonsensitized RhD negative women.

Conclusion: Determination of the fetal RhD status from cell-free fetal DNA in maternal plasma in the first trimester of pregnancy is feasible and highly accurate, and so it allows to think about replacing general routine immunoprophylaxis in all pregnant women.

Key words: Fetal RhD genotyping; Cell free fetal DNA; Real-time polymerase chain reaction; Prenatal diagnosis; First trimester.

Introducción

La inmunización contra el antígeno RhD eritrocitario tiene una gran importancia clínica durante el embarazo, y es la causa más frecuente de enfermedad hemolítica en el feto y el recién nacido. A pesar del uso sistemático de inmunoglobulina anti-D (RhIG) profiláctica, esta entidad ha disminuido su incidencia pero no está erradicada y es aún una importante causa de morbi-mortalidad perinatal¹⁻⁴.

La profilaxis anti-D postnatal se introdujo en los años 70, y disminuyó la incidencia de inmunización en mujeres Rh negativas del 14 al 1,5%^{5,6}. Además, en muchos países la inmunoprofilaxis anti-D se ofrece también prenatalmente al inicio del tercer trimestre del embarazo, lo que ha llevado a una reducción adicional de las tasas de inmunización materna del 0,2 al 0,4%⁷⁻⁹.

Sin embargo, aproximadamente el 40% de las gestantes Rh negativas llevan en su seno un feto también Rh negativo y no están en riesgo de inmunización, y por tanto no necesitarían recibir RhIG a las 28 semanas de gestación. La inmunoglobulina anti-D es una sustancia extraña extraída del plasma de sujetos voluntarios inmunizados, y por tanto deberían realizarse esfuerzos para evitar la exposición innecesaria a las mismas¹⁰. Así, la posibilidad de conocer el Rh fetal durante el embarazo permitiría restringirla solo a gestantes portadoras de fetos Rh positivo (alrededor del 60%)¹¹.

En gestantes ya inmunizadas, conocer este dato al inicio del embarazo también sería de ayuda en el manejo y pronóstico del mismo^{6,126}, ya que si el feto es Rh negativo no hay riesgo de enfermedad hemolítica fetal y no necesitan seguimiento específico. En caso contrario, el embarazo debe vigilarse de forma estrecha en busca de signos de anemia fetal mediante la determinación seriada del título de anticuerpos y la medición Doppler de la velocidad pico de la arteria cerebral media, así como cordocentesis y transfusión intraútero en los casos necesarios^{13,14}.

El descubrimiento del ADN fetal en el plasma materno de las mujeres embarazadas a finales del siglo XX¹⁵ nos brindó un método no invasivo, y por tanto seguro, de determinar el genotipo del grupo sanguíneo fetal basado en la detección de alelos heredados del padre no presentes en el genoma de la madre¹⁶⁻¹⁸. Desde entonces, varios grupos de investigadores han informado de buenos resultados en el genotipado del Rh fetal en madres Rh negativas¹⁹⁻²¹. Algunos estudios recientes que incluyeron cientos de gestantes no inmunizadas han estudiado muestras de sangre extraídas sobre todo en el segundo y tercer trimestres del embarazo²²⁻²⁴. Sin embargo, pocos estudios se han ocupado de la detección al inicio del embarazo²⁵⁻²⁷.

Conocer el Rh fetal en el primer trimestre presenta la ventaja adicional

de determinar qué embarazadas deben repetirse el test de Coombs en el segundo trimestre, y cuáles deben recibir RhIG en caso de someterse a procedimientos invasivos o presentar otras situaciones de riesgo de contacto de sangre materna y fetal, y por tanto de inmunización.

Se han desarrollado diversos ensayos usando ADN libre fetal para la detección de diferentes exones o combinaciones de ellos mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) con una precisión del 95 al 100% en la mayoría de los estudios, sin que ninguno de ellos se haya mostrado superior a los otros²⁰. Las principales limitaciones de estos estudios son la presencia de falsos positivos y falsos negativos debidos a la no detección de ADN fetal en la muestra.

Objetivos

El objetivo de este estudio es evaluar si el genotipado del Rh fetal realizado en sangre materna durante el primer trimestre de la gestación es suficientemente exacto y fiable para proponer su aplicación clínica rutinaria con objeto de reemplazar la inmunoprofilaxis antenatal universal de todas las gestantes Rh negativo.

Metodología

Entre enero y diciembre de 2011 aceptaron participar en este estudio prospectivo de cohortes un total de 143 embarazadas Rh negativo no inmunizadas con un embarazo único en su primera visita de embarazo en el hospital. Todas las participantes fueron controladas en el "Hospital X" y tenían planeado dar a luz en el centro. La edad de gestación se determinó mediante una fecha de última regla fiable y/o la ecografía del primer trimestre. El estudio fue aprobado por

el Comité de Ética de Investigación del Hospital.

Tras firmar el correspondiente consentimiento informado, se le extrajo a cada mujer una muestra de 5 ml de sangre venosa periférica en un tubo con anticoagulante (citrato) en la consulta de embarazo tras la primera vista prenatal. Las muestras de sangre se transportaron a un laboratorio, donde fueron inmediatamente centrifugadas a 2000 G durante diez minutos. El sobrenadante fue transferido cuidadosamente a tubos de 2 ml de polipropileno mediante pipetas con filtro y congelado a -80 °C hasta la extracción del ADN. Dicha extracción se realizó mediante minikits de ADN QIAmp Blood (Qiagen, West Sussex, Reino Unido) en una plataforma QIAcube siguiendo las recomendaciones del fabricante y su protocolo para el manejo de sangre y fluidos biológicos. Para cada muestra se utilizaron 800 µl de plasma descongelado, diluyendo el ADN purificado con 40 µl de buffer AE (Qiagen, West Sussex, Reino Unido).

Se diseñó un ensayo de PCR en tiempo real para la detección múltiple de dos diferentes secuencias del gen RhD, una secuencia de 125 pb en el exón 7 y otra de 82 pb en el exón 5, usando la secuencia del gen de la beta-globina en el feto y en la madre como control interno para la amplificación de cada muestra extraída. Como marcador de control adicional, para confirmar la presencia de ADN fetal, se realizó en paralelo análisis del gen SRY específico del cromosoma Y (DSY14), aunque este solo es aplicable en fetos masculinos.

La prueba del exón 7 amplifica además del RhD el pseudogen RhD, mientras que el exón 5 solo amplifica en gen RhD. Así, la ausencia de amplificación del exón 5 en casos de exón 7 positivo puede indicar la presencia de

pseudogen RhD²⁸. Los exones 5 y 7 fueron analizados por duplicado, y los controles positivos y negativos se analizaron en cada placa según los métodos publicados en la literatura^{16,27}.

El análisis de PCR se realizó inmediatamente tras la extracción del ADN usando un sistema ABI 7000 Real-Time PCR (Applied Biosystems) con incubación a 95 °C durante diez minutos y 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y de un minuto a 60 °C. El volumen total de PCR de 25 µl se compuso de 21 µl de mezcla PCR y 4 µl de muestra extraída.

Se consideró un resultado positivo cuando al menos una de las dos replicaciones de cada exón alcanzó el valor Cq de 38 o menos. Se consideró un resultado negativo cuando las dos replicaciones de cada exón eran indetectables, o una de la replicaciones tenía un valor Cq de 38 o más. Cuando existió discrepancia entre la amplificación de los exones 5 y 7, se extrajo nuevamente el ADN y este fue reamplificado. Si el resultado fue negativo para el exón 5 y positivo para el exón 7, el resultado global fue considerado no concluyente, al no poder excluir la presencia del pseudogen .

Los resultados del genotipado del ADN fetal libre en sangre materna se compararon con el fenotipo RhD fetal realizado en muestra de sangre de cordón tras el nacimiento, extraída en tubos anticoagulados con EDTA. Estos resultados se consideran el *gold standard* para evaluar la eficacia del genotipado RhD fetal prenatal. Los resultados de la PCR se compararon con este fenotipo y se calcularon las tasas de concordancia para los resultados positivo y negativo tanto en sangre materna como en sangre de cordón, así como la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo, y sus correspondientes intervalos de confianza del 95% (IC 95%).

Los resultados de este estudio se representan en porcentajes para las variables cualitativas y en medianas y rangos para las variables continuas.

Resultados

Durante el periodo de estudio (2011) participaron en la investigación 143 mujeres con Rh negativo. Se excluyeron las muestras de 11 gestantes debido a problemas técnicos (en tres la cantidad de sangre extraída no fue suficiente y en ocho la muestra estaba hemolizada). Se realizó el genotipado de 132 muestras de plasma. Todas las muestras fueron extraídas en el primer trimestre (media 12,0 semanas, rango 8-13+6). La edad materna osciló entre 18 y 44 años (media 30,5 años).

No pudimos obtener muestras neonatales en nueve gestantes con Rh negativo incluidas inicialmente debido a aborto o interrupción del embarazo, por lo que resultaron 123 recién nacidos en los que se pudo analizar la concordancia con el resultado de la sangre de cordón.

El genotipado con PCR en estas 123 muestras de plasma materno fue realizado por duplicado, como se ha explicado previamente, para las dos secuencias estudiadas. Cuando se obtuvo un resultado ambiguo, se consideró dudoso y se repitió nuevamente la extracción de ADN y el análisis con PCR. Este reanálisis de la segunda muestra alícuota fue necesario en 11 casos (8,9%) con resultado no concluyente en el primer análisis, y tras el mismo se obtuvo un resultado positivo o negativo en 115/123 (93,4%) de las muestras, persitiendo ocho (6,5%) no concluyentes definitivamente. Se ilustra un diagrama de flujo en la figura 1.

La concordancia del Rh neonatal determinado serológicamente y el geno-

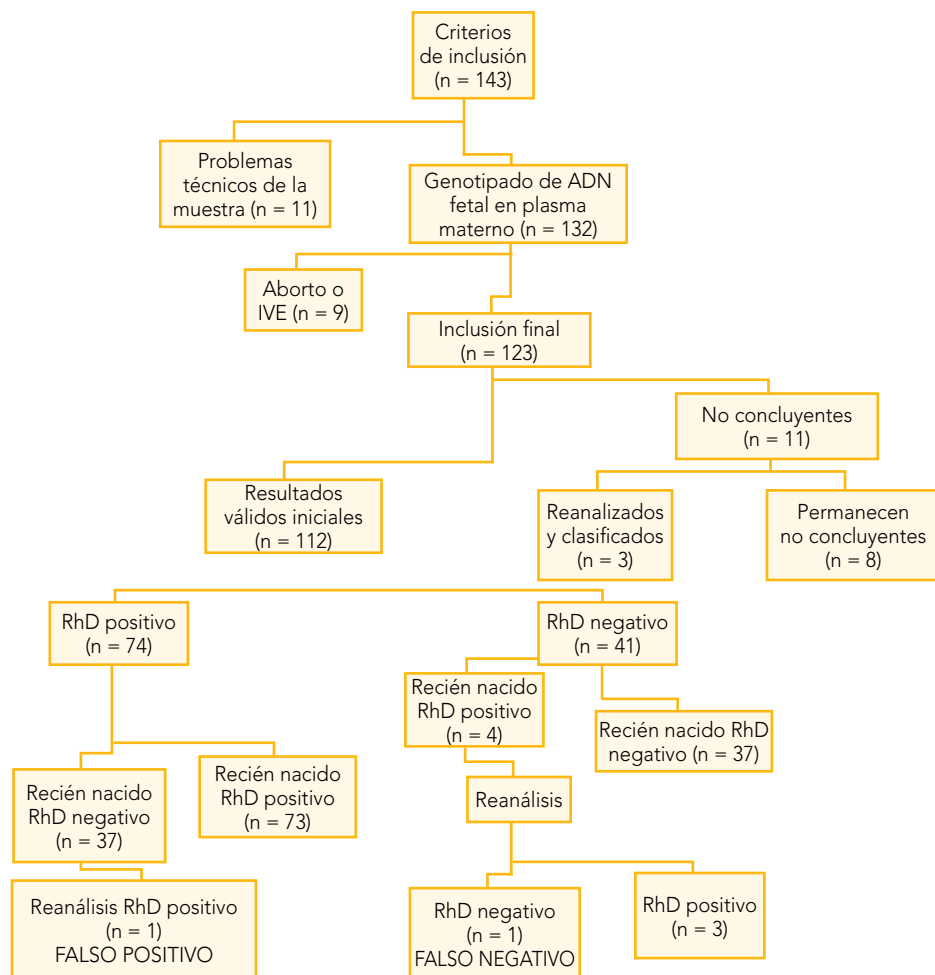


Figura 1. Resumen de los resultados del test de RhD fetal y su concordancia con los resultados serológicos de los recién nacidos

tipado en plasma materno se obtuvo inicialmente en 110 de las muestras. En los cinco casos discordantes se repitieron la serología fetal y el genotipado y dos casos quedaron finalmente como no concordantes (un falso positivo y un falso negativo) y tres quedaron correctamente clasificados.

Finalmente, se obtuvo un resultado positivo (ambos exones 5 y 7 positivos) en 74 muestras, y negativo (ambos exones

5 y 7 negativos) en 41. Setenta y tres (98,6%) y 40 (97,5%) casos, respectivamente, estaban correctamente clasificados (tabla 1). Los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo se representan en la tabla 2.

Discusión

En este estudio hemos evaluado el rendimiento de un test prenatal no in-

Tabla 1. Correlación entre el genotipado del RhD fetal y el fenotipo de los recién nacidos

Fenotipo neonatal	Genotipo fetal Exones 5 y 7		Total
	Negativo	Positivo	
Rh-negativo	40	1	41
Rh-positivo	1	73	74
Total	41	74	115

vasivo para determinar el Rh fetal al inicio de la gestación en un grupo de gestantes andaluzas. Al contrario que otros estudios con gran número de gestantes realizados en el segundo y tercer trimestres^{19-21,29}, nos hemos centrado en la determinación del Rh fetal en el primer trimestre. Hasta la fecha, no hay muchos estudios que se hayan realizado en el primer trimestre. El hecho de saber este dato al inicio del embarazo permite tomar decisiones sobre el control del mismo, tales como si a una mujer Rh negativo no sensibilizada debería repetirse el test de Coombs durante la gestación, o si una mujer sensibilizada puede ser controlada como una embarazada normal si el feto es Rh negativo. Más aún, ni en los casos de aborto ni en las interrupciones de embarazo (6,8% en nuestro estudio), en las que no se puede saber el Rh del producto del embarazo, ni en casos de potenciales acontecimientos sensibilizantes, como traumas abdominales, procedimientos invasivos o sangrados vaginales, sería necesario administrar gammaglobulina en caso que el test indicara un Rh fetal negativo²⁷.

En estudios publicados previamente, se han usado para este fin diferentes exones o combinaciones de ellos como diana en el análisis por PCR. El programa "Special Non-Invasive Advances in Fetal and Neonatal Evaluation Network of excellence" defiende la combinación de exones 5 y 7 para discriminar la presencia del pseudogen RHD ψ , muy frecuente en individuos de origen africano^{30,31}. Estudios recientes^{32,33} han descrito ensayos múltiples con diferentes combinaciones de exones 4, 5, 7 y 10. Sin embargo, la utilización de varios exones a la vez, aunque permite un aumento en la sensibilidad, ha demostrado también aumentar los resultados no concluyentes, al complicar la interpretación de los resultados, incrementando la necesidad de reanálisis²⁷. Nuestro estudio obtuvo una buena sensibilidad y especificidad usando un ensayo basado en la detección de los exones 5 y 7.

En nuestro estudio, la concordancia entre el genotipo fetal en el primer trimestre y el fenotipo en sangre de cordón tras el parto fue del 98,2% de los casos, con solo un resultado falso negativo y un resultado falso positivo. La sensibilidad obtenida (98,6%, IC 95% 92,70-99,97) es similar a la que presenta la serología en sangre de cordón (99,5%)¹⁹. En nuestro estudio, solo un caso fue falso negativo. Este tipo de error en la prueba proporciona a la gestante un incremento del 0,7% en el riesgo de aloimmunización al no recibir

Tabla 2. Validez del genotipado del RhD fetal

Parámetro	Valor (%)	IC 95%(%)
Sensibilidad	98,65	92,70-99,97
Especificidad	97,56	87,14-99,94
Valor predictivo positivo	98,65	92,70-99,97
Valor predictivo negativo	97,56	87,14-99,94

IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

profilaxis⁹, siempre que tenga una nueva gestación y el feto sea Rh positivo. La detección del gen RhD puede fallar porque haya escasa cantidad de ADN en la muestra, lo que remarca la importancia de la utilización en el ensayo de un marcador fetal universal que avale la presencia de ADN fetal. En nuestro caso, el feto era masculino y la determinación del gen del cromosoma Y se realizó con éxito.

La especificidad obtenida (97,5%, IC 95% 87,14-99,94) es también similar a la encontrada por otros autores, y ligeramente inferior a la que presenta la serología en sangre de cordón (99,7%)¹⁹, ya que en el 0,2-1% de los casos la serología puede no identificar un neonato Rh positivo correctamente clasificado con el genotipado. Esto es debido a variantes del gen RhD con expresión fenotípica débil³⁴. El hecho de asignar falsamente un Rh positivo a un feto Rh negativo tiene una importancia clínica menor, ya que el manejo de la gestación se haría de la misma forma que si no se realizara el test, es decir, con administración innecesaria de RhIG. Sin embargo, las variantes RhD con débil expresión han demostrado ser potenciales causantes de aloinmunización anti-D³⁵, y así el genotipado en sangre materna podría evitar estos casos²³.

Finning *et al.*²² obtuvieron resultados similares mediante la detección de exones 5 y 7, con un 0,2% de falsos negativos, un 0,8% de falsos positivos y un 3,4% de resultados no concluyentes en 1869 muestras tomadas como media en la semana 28. En otro estudio amplio con 1022 embarazos, Müller *et al.*²³ también describen un 0,2% de falsos negativos usando un sistema de extracción manual de ADN y un 0,1% de falsos negativos con un sistema automatizado, a una edad gestacional media de 25 semanas. Los falsos positivos fueron del 0,3% y el 0,7%, respec-

tivamente, para los dos métodos de extracción. Igualmente, Van der Schoot *et al.*³⁶, en 1257 embarazos de 30 semanas, obtuvieron un 0,2% de falsos negativos y un 0,4% de falsos positivos. En España, Macher *et al.*³⁷, estudiaron 1012 gestantes de 10 a 28 semanas y encontraron una tasa de falsos negativos de 0 y 1,1% de falsos positivos.

En nuestro estudio se realizaron reanálisis en el 8,9% de los casos, debido a resultados dudosos, resultando finalmente como no concluyentes el 6,5%. Wikman *et al.*²⁷, en un estudio amplio con una población de 4118 embarazadas estudiando solamente el exon 4 informan de un 5,1 y un 4% de reanálisis y resultados no concluyentes, respectivamente, y señalan que estas cifras pueden deberse en su caso a un tiempo excesivo en el transporte y almacenamiento de las muestras hasta su procesamiento. En nuestro caso, las muestras fueron transportadas al laboratorio inmediatamente y procesadas en las primeras cuatro horas tras su extracción. Sin embargo, este es un punto importante a tener en cuenta en caso de implantación en la práctica clínica general y su oferta a toda la población de gestantes Rh negativo. El almacenamiento de sangre completa a temperatura ambiente puede ocasionar la destrucción de ADN fetal en la muestra, asunto especialmente importante en las primeras semanas del embarazo, cuando la cantidad de ADN fetal puede ser baja³⁸, lo que podría provocar falsos negativos^{22,23}.

Nuestros resultados demuestran que los fetos hijos de madre con Rh negativo pueden ser genotipados al inicio de la gestación con un alto nivel de exactitud, lo que nos conduce a afirmar que probablemente estamos en condiciones de aceptar este test como seguro y fiable para aplicarlo en la práctica clínica habitual y ofrecerlo a las gestantes durante el primer trimestre del em-

barazo. La aplicación de este protocolo, aunque aún podría provocar la administración innecesaria de RhIG al 2% de las madres de fetos con Rh negativo, podría evitar tratar innecesariamente al 34% (40/115) de las mujeres RhD negativas no sensibilizadas, evitando así los riesgos de la exposición a material biológico extraño.

Se ha argumentado en contra de la determinación al inicio de la gestación diciendo que la concentración de ADN fetal libre en el torrente sanguíneo materno es menor que en etapas más avanzadas de la gestación, con una tasa algo superior de falsos negativos³⁹. Akolekar *et al.*⁴⁰, en un estudio reciente con 591 gestantes en el primer trimestre encontraron un 3,5% de falsos negativos y un 14,3% de resultados no concluyentes. Sin embargo, nuestros resultados demuestran una alta exactitud en el test cuando se realiza en el primer trimestre.

Por último, es preciso realizar alguna consideración sobre los aspectos económicos de prescribir innecesariamente RhIG. Considerando un 40% de gestantes con Rh negativo, esta nueva estrategia de control prenatal ahorraría aproximadamente 4800 €/1000 partos atendidos en un hospital en profilaxis innecesarias, habiéndose estimado los costes del genotipado usando una técnica automatizada en menos de la tercera parte^{41,42}. Además, si confiamos definitivamente en este test, podría sustituir también a la determinación serológica postnatal en sangre de cordón²². En gestantes sensibilizadas, disponer de esta prueba de forma rutinaria permitiría también reducir los costes asociados a las visitas en Unidades de alto riesgo y Medicina Fetal y a determinaciones serológicas seriadas.

Szczepura *et al.*⁴³, en un reciente análisis de costes de una hipotética implantación masiva de esta prueba a toda la

población gestante de Inglaterra y Gales, no recomiendan su aplicación rutinaria dado que, según sus datos, el ahorro anual sería relativamente pequeño y compensado con un posible incremento en la tasa de sensibilización materna derivado de los falsos negativos. Sin embargo, estos autores admiten que, si la prueba se realizara en el primer trimestre, la relación coste-beneficio sería superior. En otro reciente análisis, Benachi *et al.*⁴⁴ Concluyen que los costes de la profilaxis con RhIG serían compensados por el genotipado fetal solo si la prueba pudiera ofrecerse a un precio máximo de 71,21 €.

Sin embargo, además de los costes, es preciso también tener en cuenta los aspectos médicos del problema, considerando que existe un beneficio clínico claro si se ofrece el test a todas las gestantes con Rh negativo, al evitar analíticas innecesarias y sobre todo administración de gammaglobulinas.

Conclusiones

En resumen, nuestro estudio demuestra que la determinación del Rh fetal en sangre materna en el primer trimestre del embarazo es altamente sensible, exacto y preciso, y sugiere que estamos en el momento adecuado para su aplicación clínica rutinaria. Además, es probable que suponga un ahorro de costes, evitando la administración de gammaglobulina de forma innecesaria, un producto que no es precisamente barato⁴⁵.

Probablemente, la fiabilidad de la prueba permita reemplazar la profilaxis prenatal rutinaria por el genotipado del ADN fetal en sangre materna en el primer trimestre, que se convertiría así en el *gold standard* para la determinación del Rh fetal, seguida de la profilaxis prenatal dirigida solamente a aquellas gestantes portadoras de un

feto Rh positivo⁴⁶. Sin embargo, los procedimientos manuales de laboratorio aún deben desarrollarse y convertirse en automatizados, o bien desarrollarse kits comerciales más rápidos y susceptibles de ser monitorizados mediante programas externos de control de calidad. Los falsos negativos aún siguen siendo un reto a superar para su uso clínico generalizado. Probablemente sean necesarios estudios poblacionales a gran escala realizados en el primer trimestre.

Bibliografía

1. Bowman JM. RhD hemolytic disease of the newborn. *N Engl J Med*. 1998;339:1775-7.
2. Eder A. Update on HDFN: new information on long-standing controversies. *Immunohematology*. 2006; 22:188-95.
3. Urbaniak S, Greiss S. RhD haemolytic disease of the fetus and the newborn. *Blood Rev*. 2000;14:44-61.
4. Koelewijn JM, de Haas M, Vrijkotte TGM, van der Schoot CE, Bonsel GJ. Risk factors for RhD immunisation despite antenatal and postnatal anti-D prophylaxis. *BJOG*. 2009; 116:1307-14.
5. Urbaniak SJ. The scientific basis of antenatal prophylaxis. *Br J Obstet Gynaecol*. 1998;105(suppl):11-8.
6. Moise KJJ. Management of rhesus alloimmunization in pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2008;112:164-76.
7. Crowther C, Middleton P. Anti-D administration after childbirth for preventing Rhesus alloimmunisation. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000;(2):CD000021.
8. Mayne S, Parker JH, Harden TA, Dodds SD, Beale JA. Rate of RhD sensitisation before and after implementation of a community based antenatal prophylaxis programme. *BMJ*. 1997;315:1588.
9. National Institute for Clinical Excellence. Technology appraisal guidance 41. Guidance on the use of routine antenatal anti-D prophylaxis for RhD-negative women. London: NICE; 2002.
10. Foster RP, McIntosh RV, Welch AG. Hepatitis C from anti-D immunoglobulin. *Lancet*. 1995;346:372.
11. Van der Schoot CE, Soussan AA, Koelewijn J, Bonsel G, Paget-Christiaens LG, de Haas M. Non-invasive antenatal RhD typing. *Transfus Clin Biol*. 2006;13:53-7.
12. Poissonier MH, Brossard Y, Demeideros N, Vassileva J, Parnet F, Larsen M, et al. Two hundred intrauterine exchange transfusions in severe blood incompatibilities. *Am J Obstet Gynecol*. 1989;161:709-13.
13. Bianchi DW, Avent ND, Costa JM, van der Schoot CE. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal rhesus D: ready for Prime(r) time. *Obstet Gynecol*. 2005;106:841-4.
14. 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 N Y Acad Sci*. 2004; 1022:119-23.
15. Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CWG. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997; 350:485-7.
16. Lo YM, Bowell PJ, Selinger M, Mackenzie IZ, Chamberlain P, Gillmer MD, et al. Prenatal determination of fetal RhD status by analysis of peripheral blood of rhesus ne-

- gative mothers. *Lancet*. 1993;341:1147-8.
17. Faas BH, Beuling EA, Christiaens GC, dem Borne AE, van der Schoot CE. Detection of fetal RHD-specific sequences in maternal plasma. *Lancet*. 1998;352:1196.
 18. Lo YM, 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*. 1998;339:1734-8.
 19. Geifman-Holtzman O, Grotegut CA, Gaughan JP. Diagnostic accuracy of noninvasive fetal Rh genotyping from maternal blood—a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;195:1163-73.
 20. Daniels G, Finning K, Martin P, Massey E. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal blood group phenotypes: current practice and future prospects. *Prenat Diagn*. 2009;29:101-7.
 21. Freeman K, Szczepura A, Osipenko L. Non-invasive fetal RHD genotyping tests: a systemic review of the quality of reporting of diagnostic accuracy in published studies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2009;142:91-8.
 22. 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. *BMJ*. 2008;336:816-8.
 23. Muller SP, Bartels I, Stein W, Emons G, Gutensohn K, Köhler M, et al. The detection of the fetal D status from maternal plasma for decision making on Rh prophylaxis is feasible. *Transfusion*. 2008;48:2292-301.
 24. Clausen BF, Christiansen M, Steffensen R, Jørgensen S, Nielsen C, Jakobsen MA, et al. Report of the first nationally implemented clinical routine screening for fetal RHD in RhD negative pregnant women to ascertain the requirement for antenatal RhD prophylaxis. *Transfusion*. 2012;52:752-8.
 25. Cardo L, García BP, Álvarez FV. Non-invasive fetal RHD genotyping in the first trimester of pregnancy. *Clin Chem Lab Med*. 2010;48:1121-6.
 26. Akolekar R, Finning K, Kuppusamy R, Daniels G, Nicolaidis KH. Fetal RHD genotyping in maternal plasma at 11–13 weeks of gestation. *Fetal Diagn Ther*. 2011;29:301-6.
 27. Wikman AT, Tiblad E, Karlsson A, Olsson ML, Westgren M, Reilly M. Noninvasive Single-Exon Fetal RHD Determination in a Routine Screening Program in Early Pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2012;120: 227-34.
 28. Finning KM, Martin PG, Soothill PW, Avent ND. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion*. 2002;42:1079-85.
 29. Grill S, Banzola I, Li Y, Rekhviashvili T, Legler TJ, Müller SP, et al. High throughput noninvasive determination of foetal Rhesus D status using automated extraction of cellfree foetal DNA in maternal plasma and mass spectrometry. *Arch Gynecol Obstet*. 2009;279:533-7.
 30. Daniels G, van der Schoot CE, Olsson ML. Report of the first international workshop on molecular blood group genotyping. *Vox Sang*. 2005;88:136-42.
 31. Singleton BK, Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E, Daka A, et al. The presence of an RHD pseu-

- dogene containing a 37 base pair duplication and nonsense mutation in Africans with the RhD-negative blood group phenotype. *Blood*. 2000;95:12-8.
32. Tynan JA, Angkachatchai V, Ehrich M, Paladino T, van den Boom, Oeth P. Multiplexed analysis of circulating cell-free fetal nucleic acids for noninvasive prenatal diagnostic RHD testing. *Am J Obstet Gynecol*. 2011;204:251.e1-6.
 33. Bombard AT, Akolekar R, Farkas DH, van Agtmael AL, Aqinu F, Oeth P, et al. Fetal RHD genotype detection from circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma in nonsensitized RhD negative women. *Prenat Diagn*. 2011;31:802-8.
 34. Denomme GA, Dake LR, Vilensky D, Ramyar L, Judd WJ. Rh discrepancies caused by variable reactivity of partial and weak D types with different serologic techniques. *Transfusion*. 2008;48:473-8.
 35. Flegel WA, Khull SR, Wagner FF. Primary anti-D immunization by weak D type 2 RBCs. *Transfusion*. 2000;40:428-34. van der Schoot CE, Ait Soussan A, Dee R, Bonsel GJ, de Haas M. Screening for foetal RhD-genotype by plasma PCR in all D-negative pregnant women is feasible. *Vox Sang*. 2004;87s3:9.
 36. Macher HC, Noguerol P, Medrano-Campillo P, Garrido-Márquez MR, Rubio-Calvo A, Carmona-González M, et al. Standardization non-invasive fetal RHD and SRY determination into clinical routine using a new multiplex RT-PCR assay for fetal cell-free DNA in pregnant women plasma: results in clinical benefits and cost saving. *Clin Chim Acta*. 2012;413:490-4.
 37. Muller SP, Bartels I, Stein W, Emons G, Guthenson K, Legler TJ. Cell-free fetal DNA in specimen from pregnant women is stable up to 5 days. *Prenat Diagn*. 2011;31:1300-4.
 38. Finning K, Martin P, Summers J, Daniels G. Fetal genotyping for the K (Kell) and Rh C, c, and E blood groups on cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Transfusion*. 2007;47:2126-33.
 39. Akolekar R, Finning K, Kuppusamy R, Daniels G, Nicolaides KH. Fetal RHD genotyping in maternal plasma at 11-13 weeks of gestation. *Fetal Diagn Ther*. 2011;29:301-6.
 40. Daniels G, Finning K, Martin P, Soothill P. Fetal blood group genotyping from DNA from maternal plasma: an important advance in the management and prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn. *Vox Sang*. 2004;87: 225-32.
 41. Moise KJ. Fetal RhD typing with free DNA in maternal plasma. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;192:663-5.
 42. Szczepura A, Osipenko L, Freeman K. A new fetal RHD genotyping test: costs and benefits of mass testing to target antenatal anti-D prophylaxis in England and Wales. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2011;18(11):5.
 43. Benachi A, Delahaye S, Leticee N, Jouannic JM, Ville Y, Costa JM. Impact of non-invasive fetal RhD genotyping on management costs of rhesus-D negative patients: results of a French pilot study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2012;162:28-32.
 44. Franklin IM. Prevention of rhesus haemolytic disease of the fetus and newborn. *Lancet*. 2009;373:1082.
 45. Queenan JT. Rh immunoprophylaxis and fetal RHD genotyping: where are we going? *Obstet Gynecol*. 2012;120:219-20.