

# Diagnóstico del RhD fetal en el plasma materno en el Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla, España)

## Diagnostic of fetal RhD in maternal plasma at the Clinical Biochemistry Service of the Hospital Universitario Virgen del Rocío (Seville, Spain)

H MACHER<sup>1</sup>, P MEDRANO-CAMPILLO<sup>1</sup>, P NOGUEROL<sup>2</sup>, A RUBIO<sup>1</sup>,  
A LEON-JUSTEL<sup>1</sup>, A URBANO<sup>2</sup>, \*MR GARRIDO<sup>3</sup> Y JM GUERRERO<sup>1</sup>

### Resumen

La aloinmunización contra el antígeno de superficie eritrocitario, el RhD, es la causa más común de la Enfermedad Hemolítica del Feto y del Recién Nacido. El conocimiento del RhD fetal en mujeres con anticuerpos anti-D, facilita el manejo del embarazo y evita procedimientos innecesarios en aquellas mujeres que portan un feto RhD negativo. Desde que en 1997 se describió la presencia de ADN fetal libre y circulando junto al ADN circulante materno en el suero de la gestante se abrió el campo para la detección del gen *RhD* fetal en el plasma de embarazadas RhD-negativas. En el presente trabajo evaluamos la factibilidad de tipaje del RhD fetal en el plasma materno, mediante la extracción del ADN por métodos automáticos y la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real, de los exones 5 y 7 del gen *RhD*. Los resultados obtenidos con esta técnica arrojaron un 100% de sensibilidad y 95% de especificidad, con una precisión del 97%. En conclusión este es un método muy adecuado para el diagnóstico de rutina del RhD fetal.

**Palabras clave:** ADN circulante, ADN libre, diagnóstico prenatal, tipaje del RhD.

### Abstract

Alloimmunization against the RhD red cell surface antigen is the most common cause of Fetus and Newborn Haemolytic Disease. Knowledge of fetal D type in women with anti-D makes management of the pregnancy safe, and avoids unnecessary procedures in women carrying a D-negative fetus. Since in 1997 was described that fetal DNA can be found free (cell not bound) circulating in maternal serum during gestation, the field for the fetal RhD detection in the maternal plasma was open. We evaluate the feasibility of fetal D typing in maternal plasma, using automatic robot technique for DNA extraction and real-time quantitative polymerase chain reaction against exons 5 and 7 from *RHD* gene. Fetal RhD positive diagnosis was confirmed after birth and we obtained 100% sensitivity and 95% specificity. The technique accuracy was 97%. We conclude that this is an adequate technique for rutinal diagnosis of fetal RhD.

**Key words:** Circulating DNA, Cell-free DNA, Prenatal diagnosis, RhD typing.

### Introducción

La incompatibilidad del grupo sanguíneo Rhesus D (RhD) entre la madre y el feto puede resultar en aloinmunización materna, donde los anticuerpos Anti-D producidos, cruzan la barrera placentaria y

atacan a los glóbulos rojos fetales provocando la Enfermedad Hemolítica del Feto y el Recién Nacido, pudiendo ocasionar desde anemia fetal hasta la muerte del feto. Este evento ocurre generalmente después del nacimiento de un bebé RhD positivo al término del

<sup>1</sup> Servicios de Bioquímica Clínica.

<sup>2</sup> Hematología y Hemoterapia, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS)/CSIC/Universidad de Sevilla, Sevilla, España.

<sup>3</sup> Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

\* A quien debe dirigirse la correspondencia: email: [mrqarrido11@hotmail.com](mailto:mrqarrido11@hotmail.com)

embarazo. Sin embargo, otros eventos relacionados con el mismo, como el aborto electivo o espontáneo, pueden resultar en formación de anticuerpos. Aunque el embarazo en el cual se produjo la aloinmunización no afecte al niño, los niños futuros poseen un riesgo considerable de manifestar la enfermedad (Avent, 2008 a,b, 2009; Mannessier, 2009).

El diagnóstico prenatal de diversas patologías tales como aneuploidías, el genotipaje del RhD fetal y de otras enfermedades ligadas a un sólo gen está siendo utilizado desde mediados de la década de los 90 y se ha constituido en una gran ayuda en el manejo clínico temprano de esos casos. Inicialmente, estas pruebas eran realizadas utilizando ADN fetal extraído por métodos invasivos de las vellosidades coriónicas y muestras obtenidas por amniocentesis, sin embargo, estos procedimientos invasivos están asociados a cierto riesgo para el feto y/o la madre, por lo que recientemente, se ha realizado un esfuerzo considerable en el desarrollo de procedimientos de diagnóstico prenatal no invasivos (Sekizawa y col., 2001 a,b, 2002, 2007; Okai, 2007; Daniels y col., 2004, 2009).

Desde que en 1997 Lo y col., describieron la existencia de ADN fetal libre, circulante, en el suero materno durante la gestación, se abrió un nuevo campo para el diagnóstico prenatal, no invasivo, del estatus genético del feto. El ADN y el ARN fetales pueden ser detectados desde la 5ª semana de gestación y desaparecen rápidamente después del parto (Farina, 2005; Galbiati y col., 2005; Li y col., 2006 a; Liu y col., 2007).

Aunque el ADN fetal libre comprende solo del 3 al 6% del ADN libre, circulante total, cuando la secuencia fetal de interés no tiene una contrapartida materna, (ej: ADN cromosomal Y, o el gen RhD, cuando la madre es negativa), ha sido posible obtener excelentes resultados en la detección y cuantificación de estos genes por técnicas tales como la reacción de cadena polimerasa a tiempo real (RT-PCR) (Norbury y Norbury, 2008; Lo y col., 2007; Lo y Chiu, 2008; Daniels y col., 2009). Adicionalmente, en los últimos años se ha reportado una aproximación alternativa, a través del análisis del ARN fetal circulante en el suero de la madre, el cual tiene diferencias epigenéticas con el ARN materno, independientemente del sexo del feto (Bauer y col., 2006; Lo y Chiu, 2008).

La primera técnica con utilidad clínica real, ya utilizada en pruebas diagnósticas de rutina en muchos países de Europa, consiste en la determinación del RhD fetal en el plasma/suero materno. Cuando la madre no expresa el antígeno RhD en sus eritrocitos (RhD-), es esencial evitar una posible enferme-

dad hemolítica en el recién nacido (Harper y col., 2004; Zhou y col., 2005; Brojer y col., 2005). Hasta el momento, la prevención de esta patología consiste en la administración, vía intramuscular, de  $\gamma$ -globulina anti-D humana, a estas mujeres, en la semana 28 de gestación. Posparto, si el recién nacido es RhD+, se le administra una segunda dosis a la madre. Sin embargo, aproximadamente el 40% de las mujeres gestantes RhD-, portan un feto RhD- y no necesitarían ser expuestas a este tratamiento si el estatus del RhD fetal es diagnosticado antes de la semana 28 de gestación (Finning y col., 2002, 2008, 2009).

El uso del ADN fetal circulante en el plasma materno como una herramienta de diagnóstico hace posible detectar el estatus del RhD fetal a partir de la octava-décima semana de gestación, siendo de especial interés cuando la gestante está sensibilizada (con anticuerpos anti RhD circulantes en su sangre) permitiendo una gestación normal si el feto es RhD-, o caso contrario, si el feto es RhD+, estar bajo una vigilancia adecuada y constante (Geifman-Holtzman y col., 2006).

El diagnóstico del RhD fetal en el suero materno, constituye un ensayo seguro, con un porcentaje descrito que varía entre 94,8% y 100% de exactitud, y con una especificidad cercana al 100% (Geifman-Holtzman y col., 2006). Es importante recalcar esta alta especificidad en la detección del RhD fetal ya que el ADN fetal circulante no puede proceder de un parto anterior puesto que la vida media del mismo después del parto es de 16.3 min (Geifman-Holtzman y col., 2006; Krog y col., 2007; Sekizawa y col., 2007).

En la población caucásica, la negatividad al RhD es generalmente ocasionada por la delección del gen *RHD*. En contraste, en africanos negros y en poblaciones suramericanas y de Brasil, la negatividad del RhD puede ser generada por la pérdida parcial del gen *RHD* debido a intercalaciones de los genes *RHCE* en la zona central del gen *RHD*, generando secuencias híbridas *RHD/RHCE*. En estas poblaciones puede ocurrir igualmente translocaciones de regiones parciales del gen *RHD*, generando una secuencia no codificante del gen (Van der Schoot y col., 2003; Rodrigues y col., 2002; Hromadnikova y col., 2005; Grootkerk-Tax y col., 2005). En ambos casos el antígeno RhD no está expresado en la superficie del eritrocito, pero algunos exones del gen *RHD* pueden ser amplificados en el suero materno generando falsos RhD+. Este hecho debe ser considerado cuando se realice el diagnóstico tomando en cuenta el incremento de las migraciones y la globalización de la población mundial. Otro hecho que debe considerarse

en el diseño experimental es la longitud del ADN circulante fetal, la cual es predominantemente de 100 a 300 pb (Puszyk y col., 2008; Grootkerk-Tax y col., 2006) y utilizar las secuencias adecuadas para minimizar resultados negativos falsos.

Teniendo en cuenta todos esos antecedentes, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la eficacia y precisión del análisis mediante PCR a tiempo real, en el diagnóstico del gen RHD para la detección temprana de fetos con riesgo de enfermedad hemolítica y el consiguiente tratamiento profiláctico de la gestante, amplificando dos secuencias del gen RhD con una longitud máxima de 200 pb en los exones 5 y 7 (Grootkerk-Tax y col., 2006). Adicionalmente se realizó como control interno y a fin de confirmar la presencia de ADN fetal en las muestras, la determinación del sexo del feto mediante el gen SRY perteneciente al cromosoma Y (sex determining región Y).

## Materiales y Métodos

### PACIENTES Y MUESTRAS

Se realizó el genotipaje fetal en 100 muestras de plasma de mujeres entre las semanas 10 a 37 de gestación. Las muestras de sangre de las mujeres embarazadas con RhD negativo fueron recolectadas en tubos con EDTA, durante el proceso de cuidado prenatal rutinario para tipaje de ABO y RhD y detección de anticuerpos no esperados. El control positivo para los genes RhD y SRY fue un hombre heterocigoto RhD+ y el control negativo fue una mujer no gestante RhD-. El plasma fue obtenido por centrifugación (3.500 rpm). Las muestras fueron transferidas a criotubos nunc CryoTube Vials (Apogent), almacenados a -20°C, y recentrifugados a 3500 rpm antes de la extracción del ADN. Es importante resaltar el paso de la recentrifugación previamente a la extracción del ADN. Este último paso resultó especialmente útil para evitar la aparición de falsos negativos debido a la presencia de fibrina en la muestra.

### EXTRACCIÓN DEL ADN

El ADN fue extraído automáticamente de 400µL de plasma usando el MagNa Pure Compact Instrument (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) junto con el Magna Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I de acuerdo al protocolo de extracción Total DNA Plasma 100 400 V3 1. El ADN fue eluido en un volumen final de 50µL de agua y almacenado a -20°C hasta su posterior ensayo (para comparación de métodos ver Legler y col., 2007).

### PCR A TIEMPO REAL

Se realizó el análisis por PCR a tiempo real utilizan-

do el protocolo TaqMan para el ensayo y se utilizó un termociclador Light-Cycler 2.0 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Las sondas TaqMan para el exón 7 del gen RhD y del gen SRY fueron marcadas en el extremo 5' con el fluorocromo FAM; el exón 5 del RhD fue marcado en el extremo 5' con el fluorocromo VIC. Todas las sondas TaqMan fueron marcadas en el extremo 3' con el fluorocromo TAMRA (Tabla I). El amplicón para el exón 7 tiene 122 pb de longitud, el exón 5, 82 pb y el SRY 137 pb. 5µl del ADN extraído fueron amplificados en un volumen de reacción de 20µl utilizando el LighCycler FastStar DNA Master Plus HybProbe (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Todas las sondas fueron utilizadas a una concentración de 100 nmol/L y las concentraciones de los primers fueron de 200 nmol/L. Las condiciones de los ciclos de la PCR fueron: 95°C por 10 min. Después: 48 ciclos a 95°C por 15 s, y 60 °C por 1 min. Cada muestra fue analizada por duplicado.

## Resultados

En el presente trabajo analizamos una cohorte de 102 muestras de plasma de mujeres embarazadas, RhD- de las cuales 30% eran menores de 30 años, 63% con edades comprendidas entre los 30 y los 40, y 7% eran mayores de 40 años. Dos embarazos terminaron en aborto y 100 resultaron en recién nacidos sanos, 25 por cesárea, 24 fuera de plazo con 40-42 semanas de gestación y dos embarazos fueron gemelares. 42% de las gestantes estudiadas tuvieron recién nacidos RhD-. El diagnóstico del ADN circulante fetal está ilustrado en la Tabla II. La verificación de los resultados de los RhD en los bebés recién nacidos fue realizada según el protocolo de rutina.

En los resultados presentados obtuvimos un 100% de sensibilidad y un 95,1% de especificidad para el diagnóstico de los RhD+. Por otro lado, obtu-

Tabla I  
Cebadores (primers) y marcadores fluorogénicos utilizados

Primers/Cebadores	Secuencias (5'-3')
Exon 5 Directo	CGCCCTCTTCTGTGGATG
Exon 5 Reverso	GAACACGGCATTCTTCCTTC
Exon 7 Directo	GGGTGTTGTAACCGAGTGCTG
Exon 7 Reverso	GGGTGTTGTAACCGAGTGCTG
SRY Directo	TGGCGATTAAGTCAAATTCGC
SRY Reverso	CCCCCTAGTACCCTGACAATGTATT
Exon5 /marcador-VIC	TCTGGCCAAGTTTCAACTCTGCTCGCT
Exon7 /marcador-FAM	CCCACAGCTCCATCATGGGCTACAA
SRY /marcador- FAM	AGCAGTAGAGCAGTCAGGGAGGCAGA

Tabla II  
Resultados del Diagnóstico del RhD

	RhD + al nacimiento	RhD - al nacimiento	Total
RhD + en el plasma de la gestante	58	0	58
RhD - en el plasma de la gestante	3	39	42
Total	61	39	100
Sensibilidad			95.1%
Especificidad			100%
Valor predictivo positivo			100%
Valor predictivo negativo			92.9%
Porcentaje de falsos positivos			0%
Porcentaje de falsos negativos			4.9%
Precisión			97%

vimos un 100% de especificidad en el diagnóstico de los fetos RhD- y 95,1% de sensibilidad, con una precisión del 97%. Así, y de acuerdo con el criterio de evitar un falso diagnóstico RhD-, una especificidad del 100% constituye un resultado muy positivo que asegura que todas las mujeres gestantes RhD- con un feto RhD+, reciban la inmunoprofilaxis. Los tres falsos positivos obtenidos se deben presumiblemente a contaminación de muestras en la manipulación previa.

En el presente protocolo, cuando se obtuvo un resultado no concluyente, se clasificó la muestra como RhD+. Según se muestra en la Figura 1, un resultado es considerado no concluyente cuando los duplicados del análisis por PCR no concuerdan.

En cuanto a la determinación del sexo, reportamos una sensibilidad del 88%, según se muestra en la Tabla III; 7 resultados asignados no resultaron acertados debidos posiblemente a la baja edad gestacional de 3 de los casos y/o a la probable contaminación de las muestras.

## Discusión

La aloinmunización contra el antígeno de superficie eritrocitario RhD, constituyó la causa más común de morbilidad y mortalidad fetal y neonatal, previo a la introducción de la profilaxis con inmunoglobulina anti-D en la década de los 60. Sin embargo, a pesar del éxito de esta profilaxis, persisten ciertos riesgos tanto para la madre como para el feto tales como contaminaciones virales o por priones, ejemplificada por la infección de centenares de mujeres con el

virus de hepatitis C por la administración de inmunoglobulina Anti-RhD en Irlanda en los años 1977-1978 (Kenny-Walsh, 1999; Finning y col., 2009).

Al ser demostrado en 1997 por Lo y col., que alrededor del 3-6% del ADN libre en el plasma de la mujer embarazada, es de origen fetal, se abrió un nuevo y prometedor campo para el diagnóstico prenatal, no invasivo, de diversas enfermedades y para la predicción del fenotipo fetal RhD, instaurándose como técnica rutinaria de diagnóstico en numerosos países (Finning y col., 2009).

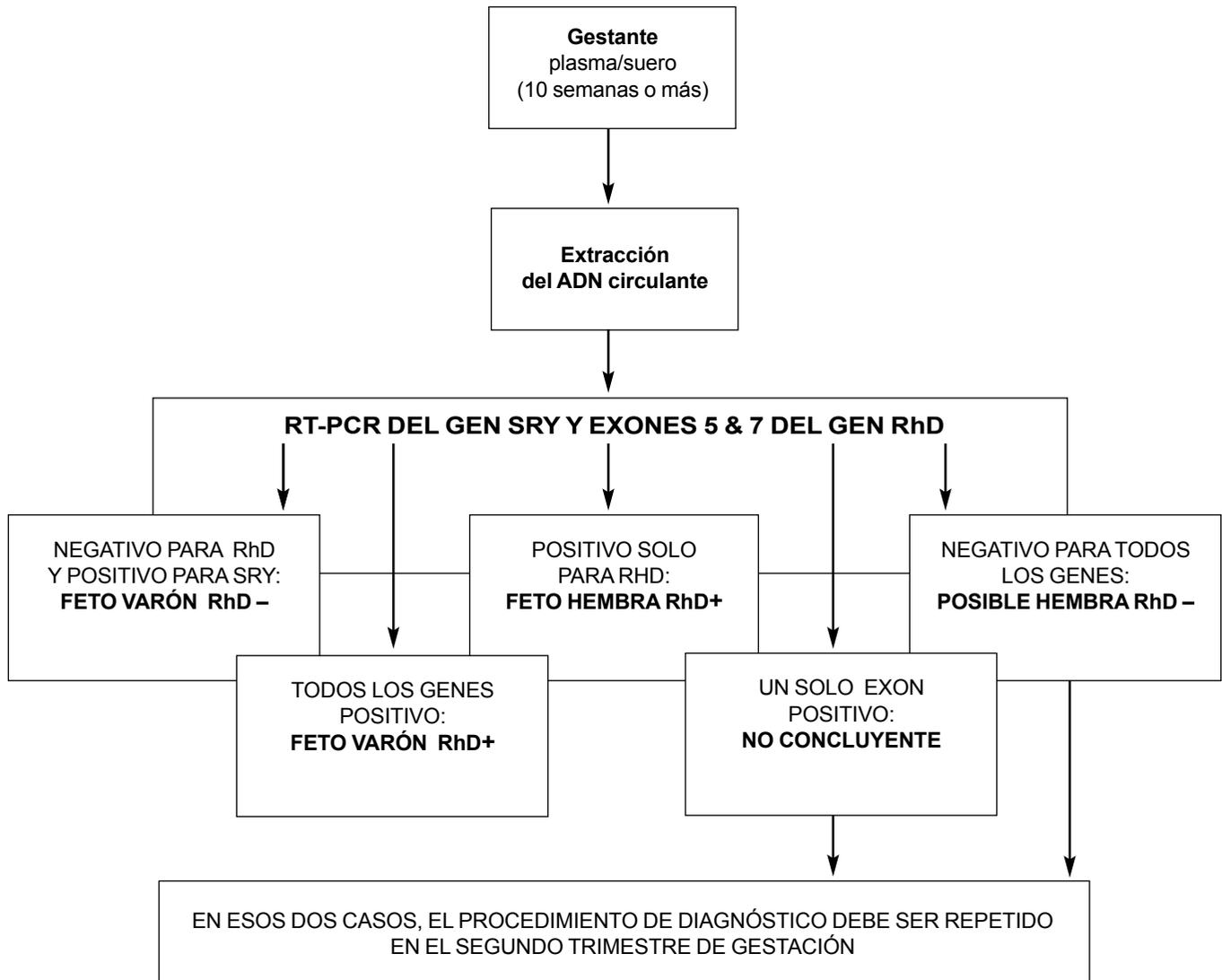
Los beneficios y eficiencia de esta herramienta de diagnóstico resultan evidentes ya que cerca del 40% de las mujeres gestantes RhD-, no necesitarán la inmunoprofilaxis con  $\gamma$ globulina si se conoce el tipo de RhD fetal con anterioridad a la semana número 28 de gestación.

Las madres inmunizadas entran en la categoría de «embarazos de alto riesgo» y requieren de estricta vigilancia durante el tiempo de gestación con el fin de evitar la ocurrencia de la Enfermedad Hemolítica del Feto y Recién Nacido que puede ocurrir principalmente en el tercer trimestre de gestación.

En el presente trabajo, demostramos que es posible evitar la profilaxis innecesaria en un 42% de gestantes RhD-, mediante una técnica segura para el feto y con alta sensibilidad y especificidad. En el diagnóstico del RhD- fetal, es importante enfatizar este 100% de especificidad en los resultados, lo que garantiza que las madres con riesgo de sensibilización, van a recibir el tratamiento profiláctico para evitarlo.

Se ha demostrado que durante el embarazo, la concentración de ADN fetal libre, no unido a células va incrementando con el tiempo, pudiendo ser detectado desde la quinta semana de gestación y alcanzando sus valores más altos durante el tercer trimestre del embarazo (Bianchi y Lo, 2001, 2006), por lo tanto, la técnica evaluada en el presente trabajo constituye un método fácil y seguro, ya que utiliza suero o plasma materno obtenido por venopunción periférica que desde la décima semana de gestación nos da el 100% de especificidad.

En la actualidad, y como mostramos en el presente trabajo, es posible realizar el genotipaje del RhD fetal en el primer trimestre y permitir que las madres con fetos RhD-, tengan un embarazo normal sin los riesgos para el feto que conlleva la amniocentesis u otras técnicas invasivas que puedan alterar los títulos de anticuerpos en la sangre materna. Adicionalmente, es importante considerar el estado de ansiedad de las madres sensibilizadas en el sentido de asegurarles una gestación saludable.



**Figura 1. Interpretación de resultados (genes SRY y exones 5 y 7 del gen RHD)**

La determinación de ácidos nucleicos fetales en el suero materno ha mostrado ser una poderosa herramienta diagnóstica, por ejemplo, se ha determinado que altas concentraciones de ADN fetal en el suero materno están asociadas a riesgo de partos prematuros (Leung y col., 1988), preeclampsia (Lo y col., 1999a; Leung y col., 2001), trisomía 21 (Lo y col., 1999b; Zhong y col., 2000), placenta invasiva (Sekizawa y col., 2002) e hiperémesis gravídica (Sekizawa y col., 2001).

Asimismo, se han obtenido excelentes resultados cuando los determinantes en estudio o mutaciones patológicas heredadas del padre y presentes en el feto, no están presentes en la madre (Bustamante-Aragones y col., 2006; Page-Christiaens y col., 2006). Con este criterio, se ha obtenido la detección prenatal, no invasiva, de diversas condiciones incluyendo el estatus del rhesus D fetal, distrofias miotónicas (Amicucci y col., 2000), ciertas translocaciones cro-

mosómicas (Chen y col., 2000; 2001), y el diagnóstico de riesgos de cáncer hereditario (Ellinger y col., 2009).

Sin embargo, cuando el gen responsable se encuentra entre los marcadores epigenéticos de la madre, se hace necesario discriminar los genes maternos de los fetales con mayor precisión (Poon y col., 2002; Tsui y col., 2006). Las moléculas de ADN libre fetal, poseen un tamaño menor que las de origen materno, y este hecho puede ser explotado para el enriquecimiento selectivo, por métodos diversos, de secuencias de ADN fetal permitiendo la detección de *loci* genéticos fetales para marcadores microsatelitales y mutaciones puntuales tales como acondroplasia y beta-talasemia (Li y col., 2006a, 2007, 2008a y b; Galbiati y col., 2006). Se han reportado en la literatura, resultados prometedores en el diagnóstico de aneuploidías fetales usando el suero materno explorando las diferencias polimórficas en secuencias

Tabla III  
Resultados del Diagnóstico del gen SRY

Pruebas con Resultado Dicotómico

	Característica Evaluada		
	Presente Nacidos varón	Ausente Nacidos hembra	
Prueba Diagnóstica+	22	4	26
Prueba Diagnóstica-	3	32	35
	25	36	61

			IC 95%	
Sensibilidad	88,0%	54,8%	a 93,0%	
Especificidad	88,9%	68,5%	a 94,3%	
Valor predictivo positivo	84,6%	50,5%	a 89,8%	
Valor predictivo negativo	91,4%	71,9%	a 96,1%	
Proporción de falsos positivos	11,1%	5,7%	a 31,5%	
Proporción de falsos negativos	12,0%	7,0%	a 45,2%	
Exactitud	88,5%	70,0%	a 91,9%	
Índice J de Youden	0,8			
CPP o LR(+)	7,92	2,18	a 14,36	Taylor Miettinen
CPN o LR(-)	0,14	0,08	a 0,65	Taylor Miettinen
Probabilidad pre-prueba (Prevalencia)	41,0%			

particulares entre los alelos maternos y paternos utilizando el ARNm fetal y determinando la relación entre los alelos (Puszyk y col., 2008; Lo y col., 2006; Tong y col., 2006).

Diversos métodos de enriquecimiento del ADN fetal, así como técnicas como MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-flight mass spectrometry) emergen como una nueva plataforma para el análisis del ADN, libre, circulante, permitiendo la detección en el ADN fetal proveniente del plasma materno, de variaciones de un solo nucleótido heredadas del padre (Ding y col., 2004; Chan y col., 2006; Chim y col., 2008).

Sin embargo, el análisis del ADN mediante el uso de RT-PCR ha resultado ser un método sencillo, fiable y de gran utilidad. Estudios comparativos realizados por Vermeersch y col. (2006) entre técnicas como MALDI-TOF MS y la RT-PCR para la determinación del gen SRY, arrojan tasas de detección muy similares con una sensibilidad del 95% y 93% respectivamente, y una especificidad idéntica para ambas técnicas.

Los resultados obtenidos por estos y otros autores, en la detección de los genes SRY mediante RT-PCR, concuerdan plenamente con los reportados en el presente trabajo (Randen y col., 2003; Vermeersch y col., 2006; Hyland y col., 2009). Asimismo, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por González-González y col. (2005) para la ciudad de Madrid.

Adicionalmente, los resultados del presente trabajo sobre el estatus del gen *RhD*, muestran concordancia con los reportados en la literatura y comprueban la utilidad del análisis de dos exones del mismo, en comparación a un solo exón, de este modo Atamaniuk y col. (2009), demuestran un 87% de precisión en la determinación del RhD, mediante PCR en tiempo real usando sondas TagMan para el exón 7. Por otra parte, Hromadnikova y col. (2005), reportan una especificidad cercana al 100% utilizando los exones 7 y 10 del gen RhD y Hyland y col. (2009) reportan un 96.45% de precisión mediante la amplificación de tres exones del gen RhD. Resultados similares han sido reportados en la población de Portugal (Pereira y col., 2007).

La revolucionaria detección del ADN fetal, libre, circulante, en el plasma materno y los avances en técnicas de investigación moleculares, han propiciado que el diagnóstico prenatal por técnicas no invasivas se traduzca en una realidad clínica. Mediante estas técnicas se hace posible la detección en el feto, de alelos heredados del padre, patologías ligadas al sexo, enfermedades de un solo gen, y es un indicador viable de predisposición a determinadas complicaciones obstétricas tales como la pre-eclampsia (Norbury y Norbury, 2008).

Debido al interés en esta área, se ha creado el proyecto SAFE (Special Non-Invasive Advances in Fetal and Neonatal Evaluation), con la finalidad de implementar de modo rutinario, la prevención prenatal y neonatal dentro y fuera de la Unión Europea y ha jugado un papel muy importante en la estandarización del genotipaje no invasivo del RHD (Maddocks y col., 2009).

En conclusión, el genotipaje para el *Rhd* realizado en el ADN fetal libre y circulante en el plasma materno constituye un método de alto rendimiento de procesamiento, factibilidad y de gran confianza de predicción, con muy baja tasa de resultados falsos negativos, considerando que ninguna prueba diagnóstica posee un 100% de sensibilidad y especificidad. La implementación de estos métodos de diagnóstico clínico prenatal, previenen el innecesario tratamiento con inmunoglobulina anti-RhD en mujeres RhD- portando fetos RhD negativos, evitando riesgo materno-fetal y la consiguiente disminución de costo para los entes públicos.

## Referencias bibliográficas

- Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. 2000. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clin Chem* 46:301-302.
- Atamaniuk J, Stuhlmeier KM, Karimi A, Mueller MM. 2009. Comparison of PCR methods for detecting fetal RhD in maternal plasma. *J Clin Lab Anal* 23: 24-28.
- Avent ND. 2008a. *RHD* Genotyping from Maternal Plasma: Guidelines and Technical Challenges. *Methods Mol Biol* 444:185-201.
- Avent ND. 2008b. Large-scale blood group genotyping – clinical implications. *Br J Haematol* 144(1):3-13.
- Avent ND, Madgett TE, Maddocks DG, Soothill PW. 2009. Cell-free fetal DNA in the maternal serum and plasma: current and evolving applications. *Curr Opin Obstet Gynecol* 21:175-179.
- Bauer M, Hutterer G, Eder M, Majer S, LeShane E, Johnson KL, Peter I, Bianchi DW, Pertl B. 2006. A prospective analysis of cell-free fetal DNA concentration in maternal plasma as an indicator for adverse pregnancy outcome. *Prenat Diag* 26:831-836.
- Bianchi DW, Lo YM. 2001. Fetomaternal cellular and plasma DNA trafficking: the Yin and the Yang. *Ann N Y Acad Sci* 945:119-131.
- Bianchi DW, Wataganara T, Lapaire O, Tjoa ML, Maron JL, Larrabee PB, Johnson KL. 2006. Fetal nucleic acids in maternal body fluids. An Update. *Ann NY Acad Sci* 1075:63-73.
- Brojer E, Zupanska B, Guz K, Orzińska A, Kalińska A. 2005. Noninvasive determination of fetal RHD status by examination of cell-free DNA in maternal plasma. *Transfusion* 45:1473-1480.
- Bustamante-Aragones A, García-Hoyos M, Rodríguez de Alba M, González-González C, Lorda-Sánchez I, Diego-Álvarez D, Trujillo-Tiebas MJ, Ayuso C, Ramos C. 2006. Detection of a paternally inherited fetal mutation in maternal plasma by the use of automated sequencing. *Ann NY Acad Sci* 1075:108-117.
- Chan KC, Ding C, Gerovassili A, Yeung SW, Chiu RW, Leung TN, Lau TK, Chim SS, Chung GT, Nicolaidis KH, Lo YM. 2006. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. *Clin Chem* 52: 2211-2218.
- Chen CP, Chern SR, Wang W. 2000. Fetal DNA in maternal plasma: the prenatal detection of a paternally inherited fetal aneuploidy (Letter). *Prenat Diagn* 20:355-357.
- Chen CP, Chern SR, Wang W. 2001. Fetal DNA analyzed in plasma from a mother's three consecutive pregnancies to detect paternally inherited aneuploidy. *Clin Chem* 47:937-939.
- Chim SS, Shing TK, Hung EC, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, Lo YM. 2008. Systematic Search for Placental DNA-Methylation Markers on Chromosome 21: Toward a Maternal Plasma-Based Epigenetic Test for Fetal Trisomy 21. *Clin Chem* 54:482-490.
- 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 Sang* 87:225-232.
- Daniels G, Finning K, Martin P, Massey E. 2009. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal blood group phenotypes: current practice and future prospects. *Prenat Diagn* 29: 101-107.
- Ding C, Maier E, Roscher AA, Braun A, Cantor CR. 2004. Simultaneous quantitative and allele-specific expression analysis with real competitive PCR. *BMC Genet* 5:8.
- Ellinger J, Müller SC, Stadler TC, Jung A, von Ruecker A, Bastian PJ. 2009. The role of cell-free circulating DNA in the diagnosis of prostate cancer. *Urol. Oncol.* En prensa.

- Farina A, Erik S, LeShane BS, Romero R, Gómez R, Chaiw-  
rapongsa T, Rizzo N, Bianchi D. 2005. High levels of  
fetal cell-free DNA in maternal serum: A risk factor for  
spontaneous preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol*  
193:421-425.
- Finning KM, Martin PG, Soothill PW, Avent ND. 2002. Pre-  
diction of fetal D status from maternal plasma: intro-  
duction of a new noninvasive fetal RHD genotyping  
service. *Transfusion* 42: 1079-1085.
- Finning K, Martin P, Summers J, Massey E, Poole G, Daniels  
G. 2008. Effect of high throughput RHD typing of fetal  
DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immuno-  
globulin in RhD negative pregnant women: prospective  
feasibility study. *B M J* 336(7648):816-818.
- Finning K, Martin P, Daniels G. 2009. The use of maternal  
plasma for prenatal RhD blood group genotyping.  
*Methods Mol Biol* 496:143-157.
- Galbiati S, Restagno G, Foglieni B, Bonalumi S, Travi M,  
Piga A, Sbaiz L, Chiari M, Damin F, Smid M, Valsecchi L,  
Pasi F, Ferrari A, Ferrari M, Cremonesi L. 2006. Diffe-  
rent Approaches for Noninvasive Prenatal Diagnosis of  
Genetic Diseases Based on PNA-Mediated Enriched  
PCR. *Ann NY Acad Sci* 1075:137-143.
- Galbiati S, Smid M, Gambini D, Ferrari A, Restagno G, Vio-  
ra E, Campogrande M, Bastonero S, Pagliano M, Calza  
S, Ferrari M, Cremonesi L. 2005. Fetal DNA detection  
in maternal plasma throughout gestation. *Hum Genet*  
117:243-248.
- Geifman-Holtzman O, Grotegut CA, Gaughan JP. 2006.  
Diagnostic accuracy of noninvasive fetal Rh genotyping  
from maternal blood-A meta-analysis. *Am J. Obstet  
Gynecol* 195:1163-1173.
- González-González C, García-Hoyos M, Trujillo-Tiebas MJ,  
Lorda-Sánchez I, de Alba MR, Infantes F, Gallego J,  
Díaz-Recasens J, Ayuso C, Ramos C. 2005. Application  
of fetal DNA detection in maternal plasma: A prenatal  
diagnosis unit experience. *J Histochem Cytochem* 53:  
307-314.
- Grootkerk-Tax MG, Maaskant-van Wijk PA, van Drunen J,  
van der Schoot CE. 2005. The highly variable RH locus  
in nonwhite persons hampers RHD zygosity determina-  
tion but yields more insight into RH-related evolution-  
ary events. *Transfusion* 45:327-337.
- Grootkerk-Tax MG, Soussan AA, de Haas M, Maaskant-van  
Wijk PA, van der Schoot CE. 2006 Evaluation of prena-  
tal RHD typing strategies on cell-free fetal DNA from  
maternal plasma. *Transfusion* 46:2142-2148.
- Harper TC, Finning KM, Martin P, Moise KJ Jr. 2004. Use of  
maternal plasma for noninvasive determination of fe-  
tal RhD status. *Am J Obstet Gynecol* 191:1730-1732.
- Hromadnikova I, Vechetova L, Vesela K, Benesova B, Dou-  
cha J, Vik R. 2005. Noninvasive fetal RHD and RHCE  
genotyping using real-time PCR testing of maternal  
plasma in RHD-negative pregnancies. *J Histochem  
Cytochem* 53:301-305.
- Hyland CA, Gardener GJ, Davies H, Ahvenainen M, Flower  
RL, Irwin D, Morris JM, Ward, CM, Hyett JA. 2009. Eva-  
luation of non-invasive prenatal RHD genotyping of the  
fetus. *Med J Aust.* 191(1): 21-25.
- Kenny-Walsh E. 1999. Clinical outcomes after hepatitis C  
infection from contaminated anti-D immune globulin.  
Irish Hepatology Research Group. *N Engl J Med.* 340  
(16): 1228-33.
- Krog GR, Clausen FB, Dziegiel MH. 2007. Quantitation of  
RHD by real-time polymerase chain reaction for deter-  
mination of RHD zygosity and RHD mosaicism/chime-  
rism: an evaluation of four quantitative methods.  
*Transfusion.* 47 (4): 715-22.
- Legler TJ, Liu Z, Mavrou A, Finning K, Hromadnikova I, Gal-  
biati S, Meaney C, Hultén MA, Crea F, Olsson ML, Mad-  
docks DG, Huang D, Fisher SA, Sprenger-Haussels M,  
Soussan AA, van der Schoot CE. 2007. Workshop re-  
port on the extraction of foetal DNA from maternal  
plasma. *Prenat Diagn* 27:824-829.
- Leung TN, Zhang J, Lau TK, Hjelm NM, Lo YM. 1998. Ma-  
ternal plasma fetal DNA as a marker for preterm la-  
bour. *Lancet* 352: 1904-1905.
- Leung TN, Zhang J, Lau TK, Chang LY, Lo YM. 2001. In-  
creased maternal plasma fetal DNA concentrations in wo-  
men who eventually develop preeclampsia. *Clin Chem*  
47: 137-139.
- Li Y, Hahn D, Wenzel F, Holzgreve W, Hahn S. 2006. Detec-  
tion of SNPs in the Plasma of Pregnant Women and in  
the Urine of Kidney Transplant Recipients by Mass  
Spectrometry. *Ann NY Acad Sci* 1075:144-147.
- Li Y, Holzgreve W, di Naro E, Vitucci A, Hahn S. 2006. Cell-  
Free DNA in Maternal Plasma. Is It All a Question of  
Size? *Ann NY Acad Sci* 1075:81-87.
- Li Y, Page-Christiaens GC, Gille JJ, Holzgreve W, Hahn S.  
2007. Non-invasive prenatal detection of achondropla-  
sia in size-fractionated cell-free DNA by MALDI-TOF MS  
assay. *Prenat. Diagn.* 2007. Jan; 27 (1) 11-7.
- Li Y, Holzgreve W, Hahn S. 2008a. Size fractionation of cell-  
free DNA in maternal plasma and its application in  
noninvasive detection of fetal single gene point muta-  
tions. *Methods Mol Biol.* 444: 239-51.
- Li Y, Finning K, Daniels G, Hahn S, Zhong X, Holzgreve W.  
2008b. Noninvasive genotyping fetal Kell blood group  
(KEL 1) using cell-free fetal DNA in maternal plasma by  
MALDI-TOF mass spectrometry. *Prenat Diagn.* 28 (3):  
203-8.
- Liu FM, Wang XY, Feng X, Wang W, Ye YX, Chen H. 2007.  
Feasibility study of using fetal DNA in maternal plasma  
for non-invasive prenatal diagnosis. *Acta Obstet Gyne-  
col Scand* 86:535-541.
- Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Sargent JL. 1997. Pre-  
sence of fetal DNA in maternal plasma and serum.  
*Lancet* 350:485-487.
- Lo YM, Leung TN, Tein MS, Sargent IL, Zhang J, Lau TK, Hai-  
nes CJ, Redman CW. 1999. quantitative abnormalities  
of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin  
Chem* 45: 184-88.

- Lo YM, Lau TK, Zhang J, Leung TN, Chang AM, Hjelm NM y col. 1999. Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clin Chem* 45: 1747-51.
- Lo YM. 2006. Fetal DNA in Maternal Plasma. *Progress through Epigenetics. Ann N Y Acad Sci* 1075:74-80.
- Lo YM, Lun FM, Chan KC, Tsui NB, Chong KC, Lau TK, Leung TY, Zee BC, Cantor CR, Chiu RW. 2007. Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:13116-13121.
- Lo YM, Chiu RW. 2008. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma nucleic acid analysis. *Clin Chem* 54:461-466.
- Maddocks DG, Alberry MS, Attilakos G, Choi K, Soothill PW, Avent, ND. 2009. The SAFE project: towards non-invasive prenatal diagnosis. *Biochem Soc Trans* 37: 460-465.
- Mannessier L. 2009. Suivi immunologique ds femmes enceintes: nouvelles recommandations. *Transfusion Clinique et Biologique* 16: 195-200.
- Norbury G, Norbury CJ. 2008. Non-invasive prenatal diagnosis of single gene disorders: How close are we?. *Semin Fetal Neonatal Med.* 13:76-83.
- Okai T. 2007. Recent advances in non-invasive prenatal DNA diagnosis through analysis of maternal blood. *J Obstet Gynaecol Res* 33:747-764.
- Page-Christiaens GC, Bossers B, van der Schoot CE, DE Haas M. 2006. Use of Bi-Allelic Insertion/Deletion Polymorphisms as a Positive Control for Fetal Genotyping in Maternal Blood. First Clinical Experience. *Ann NY Acad Sci* 1075:123-129.
- Pereira JC, Couceiro AB, Cunha EM, Machado AI, Tamagnini GP, Martins NP, Ribeiro ML. 2007. Prenatal determination of the fetal RhD group by multiplex PCR: a 7-year Portuguese experience. *Prenat Diag* 27(7): 633-637.
- Poon LL, Leung TN, Lau TK, Chow KC, Lo YM. 2002. Differential DNA Methylation between Fetus and Mother as a Strategy for Mother as a Strategy for Detecting Fetal DNA in Maternal Plasma. *Clin Chem* 48:35-41.
- Puszyk WM, Crea F, Old RW. 2008. Noninvasive prenatal diagnosis of aneuploidy using cell-free nucleic acids in maternal blood: promises and unanswered questions. *Prenat Diag* 28:1-6.
- Randen I, Hauge R, Kjeldsen-Kragh J, Fagerhol MK. 2003. Prenatal genotyping of RHD and SRY using maternal blood. *Vox Sang* 85:300-306.
- Rodrigues A, Ríos M, Pellegrino J Jr, Costa FF, Castilho L. 2002. Presence of the RHD pseudogene and the hybrid RHC-CE-D gene in Brazilians whit the D-negative phenotype. *Braz J Med Biol Res* 35:767-773.
- Sekizawa A, Saito H. 2001a. Prenatal screening of single-gene disorders from maternal blood. *Am J Pharmacogenomic* 1:111-117.
- Sekizawa A, Sugito Y, Iwasaki M, Watanabe A, Jimbo M, Hoshi S, Saito H, Okai T. 2001 b. Cell-free fetal DNA is increased in plasma of women with hyperemesis gravidarum. *Clin Chem* 47(12):2164-2165.
- Sekizawa A, Jimbo M, Saito H, Iwasaki M, Sugito Y, Yukimoto Y, Otsuka J, Okai T. 2002. Increased cell-free fetal DNA in plasma of two women with invasive placenta. *Clin Chem* 48(2):353-354.
- Sekizawa A, Purwosunu Y, Matsuoka R, Koide K, Okazaki S, Farina A, Saito H, Okai T. 2007. Recent advances in non-invasive prenatal DNA diagnosis through analysis of maternal blood. *J Obstet Gynaecol Res* 33:747-764.
- Tong YK, Ding C, Chiu RW, Gerovassili A, Chim SS, Leung TY, Leung TN, Lau TK, Nicolaidis KH, Lo YM. 2006. Noninvasive Prenatal Detection of Fetal Trisomy 18 by Epigenetic Allelic Ratio Analysis in Maternal Plasma: Theoretical and Empirical Considerations. *Clin Chem* 52:2194-2202.
- Tsui NB, Dennis Lo YM. Placental RNA in Maternal Plasma. 2006. Toward Noninvasive Fetal Gene Expression Profiling. *Ann NY Acad Sci* 1075:96-102.
- Van der Schoot CE, Tax GH, Rijnders RJ, de Haas M, Christiaens GC. 2003. Prenatal Typing of Rh and Kell Blood Group System Antigens: The Edge of a Watershed. *Transfus Med Rev* 17:31-44.
- Vermeersch P, Mariën G, Bossuyt. 2006. MALDI-TOF Mass Spectrometry compared with Real-Time PCR for detection of fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 52: 2311.
- Zhou L, Thorson JA, Nugent C, Davenport RD, Butch SH, Judd WJ. 2005. Noninvasive prenatal RHD genotyping by real-time polymerase chain reaction using plasma from D-negative pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 193:1966-1971.
- Zhong XY, Burk MR, Troeger C, Jackson LR, Holzgreve W, Hahn S. 2000. Fetal DNA in maternal plasma is increased in pregnancies with aneuploid fetuses. *Prenat Diagn* 20: 795-798.