

Aloimunização Rh na Gestação

*Autoria: Federação Brasileira das Associações de
Ginecologia e Obstetrícia*

Elabora o Final: 10 de outubro de 2011

Participantes: Brizot ML, Nishie EN, Liao AW, Zugaib M,
Simões R

O Projeto Diretrizes, iniciativa conjunta da Associa o Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, tem por objetivo conciliar informa es da área médica a fim de padronizar condutas que auxiliem o raciocínio e a tomada de decisão do médico. As informa es contidas neste projeto devem ser submetidas   avalia o e   crítica do médico, responsável pela conduta a ser seguida, frente   realidade e ao estado clínico de cada paciente.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE COLETA DE EVIDÊNCIA:

A revisão bibliográfica de artigos científicos dessa diretriz foi realizada na base de dados MEDLINE, Cochrane e SciELO. A busca de evidências partiu de cenários clínicos reais, e utilizou palavras-chaves (MeSH terms) agrupadas nas seguintes sintaxes: *Rh Isoimmunization OR Abortion, Threatened OR Abortion, Spontaneous OR Immunoglobulins OR Abortion, Induced OR Erythroblastosis, Fetal OR Fetomaternal Transfusion OR Isoantibodies OR Hemagglutination Tests OR Amniotic Fluid OR Spectrophotometry OR Ultrasonography, Doppler, Pulsed OR Blood Flow Velocity.*

GRAU DE RECOMENDAÇÃO E FORÇA DE EVIDÊNCIA:

- A:** Estudos experimentais ou observacionais de melhor consistência.
- B:** Estudos experimentais ou observacionais de menor consistência.
- C:** Relatos de casos (estudos não controlados).
- D:** Opinião desprovida de avaliação crítica, baseada em consensos, estudos fisiológicos ou modelos animais.

OBJETIVO:

Examinar as principais condutas na aloimunização Rh na gestação de acordo com as evidências disponíveis.

CONFLITO DE INTERESSE:

Nenhum conflito de interesse declarado.

INTRODUÇÃO

A aloimunização Rh consiste na sensibilização ao antígeno D presente na superfície eritrocitária. Durante a gestação e parto, pequenas quantidades de hemácias fetais podem atingir a circulação materna. Nos casos em que a grávida é Rh negativo (desprovida do antígeno D) e a criança, Rh positivo, a mãe pode ser sensibilizada e passa a produzir anticorpos anti-D. Estes atravessam a barreira placentária e acarretam doença hemolítica perinatal, a qual pode cursar com repercussões graves determinando morbidade e mortalidade fetal e perinatal aumentadas.

A aloimunização Rh na gestação é condição estudada há mais de meio século com desvendamento de sua fisiopatologia, diagnóstico, tratamento e estratégias de prevenção. Entretanto, apesar de todos esses avanços, alguns aspectos, principalmente relacionados à prevenção, ainda não são de conhecimento e aplicabilidade unânime dos obstetras e profissionais que lidam com gestantes. A seguir, abordamos as dúvidas mais frequentes relacionadas ao tema.

1. DEVE-SE ADMINISTRAR IMUNOGLOBULINA ANTI-D (IG ANTI-D) APÓS AMEAÇA DE ABORTAMENTO NO PRIMEIRO TRIMESTRE?

Não há evidências científicas que sustentem a utilização da imunoglobulina anti-D em ameaça de abortamento antes de 12 semanas de gestação. Isso porque não existem estudos na literatura demonstrando o benefício da imunoglobulina anti-D nessas situações. A recomendação de administrar imunoglobulina anti-D nas ameaças de abortamento de primeiro trimestre é baseada em consensos e opiniões de especialistas¹⁻³(D). Essa conduta é sustentada pela observação de que 0,1 mL de sangue Rh positivo é volume suficiente para causar sensibilização em voluntários masculinos Rh negativos. O volume médio de uma suposta hemorragia feto-materna com oito semanas é estimado em cerca de 0,33 mL^{4,5}(D). Outros aspectos a serem considerados são a descrição da presença de eritrócitos fetais na circulação materna a partir de 38 dias após a concepção e a demonstração de que ocorre hemorragia feto-materna em ameaça de abortamento já a partir da 7ª semana^{6,7}(C). Portanto, teoricamente, pode ocorrer sensibilização embora não tenha sido cientificamente demonstrada.

Recomendação

A administração da imunoglobulina anti-D deve ser considerada nos casos de ameaça de abortamento no primeiro trimestre, sendo essa recomendação baseada em consensos e opiniões de especialistas¹⁻³(D).

2. DEVE-SE ADMINISTRAR IMUNOGLOBULINA ANTI-D APÓS ABORTAMENTO DE PRIMEIRO TRIMESTRE?

A administração de imunoglobulina anti-D em abortamentos espontâneos antes de 12 semanas é controversa. Não há evidências clínicas que sustentem sua utilização⁸(D). Há apenas um estudo randomizado, com casuística insuficiente, que não demonstrou diferença na taxa de sensibilização comparando grupos que receberam ou não a imunoglobulina anti-D após abortamento espontâneo abaixo de 12 semanas⁹(B). Entretanto, nos casos de abortamento instrumentalizado, isto é, quando houve intervenção cirúrgica, há evidências de risco maior de sensibilização¹⁰(B).

Recomendação

Imunoglobulina anti-D deve ser administrada para todos os casos de abortamentos com intervenção cirúrgica independentemente da idade gestacional, e com o mesmo grau de evidência para os abortamentos completos após 12 semanas de gestação¹⁰(B). Para os abortamentos espontâneos completos abaixo de 12 semanas de gestação, a recomendação em favor da administração é baseada em consensos e opiniões de especialistas⁸(D).

3. DEVE-SE ADMINISTRAR IMUNOGLOBULINA ANTI-D DE ROTINA NA 28ª SEMANA DE GESTAÇÃO?

A hemorragia feto-materna ocorre mais frequentemente ao nascimento. Durante o primeiro trimestre aproximadamente 3% das gestantes apresentam quantidade suficiente para detecção de sangue fetal na circulação sanguínea. Esta porcentagem aumenta no decorrer da gestação passando a 12% no segundo trimestre e 45% no terceiro trimestre, sendo que até o nascimento, 50% das parturientes apresentarão hemácias fetais detectáveis na circulação¹¹(D). O risco da ocorrência de aloimunização Rh durante ou imediatamente após a primeira gestação encontra-se em torno de 1% sendo que administração de imunoglobulina anti-D pode reduzir este risco para cerca de 0,2% sem qualquer evento adverso. O emprego rotineiro da imunoglobulina anti-D na 28ª semana de gestação bem como sua administração em reduzidas doses com 28 e 34 semanas tem demonstrado redução dramática na ocorrência de gestantes aloimunizadas, quando analisado o período de pós-parto¹²⁻¹⁶(B).

Estudo prospectivo analisando o uso de imunoglobulina anti-D na dose de 300 µg intramuscular em primigestas ou multigesta na 28ª semana de gestação demonstrou redução significativa na ocorrência de sensibilização durante a gravidez em gestantes Rh negativas¹²(B).

O mesmo pode ser observado em outro estudo prospectivo onde o uso de imunoglobulina anti-D na dose de 100 µg intramuscular (500 UI) por primigestas durante a 28ª e 34ª semanas de gestação, em adição a administração de imunoglobulina anti-D no pós-parto ou em qualquer ocasião de risco para a ocorrência de aloimunização Rh durante a gestação, demonstrou redução no risco de sensibilização diagnosticada em gestações subsequentes de 1,3% para 0,4%¹⁷(B).

Recomendação

A administração de Imunoglobulina anti-D em gestantes Rh negativas não sensibilizadas na 28^a semana ou 28^a e 34^a semanas de gestação reduz o risco para a ocorrência de aloimunização Rh¹⁸(A).

4. NOS CASOS DE OMISSÃO HÁ BENEFÍCIO EM SE ADMINISTRAR A IMUNOGLOBULINA ANTI-D APÓS 72 HORAS DO PARTO?

A administração da imunoglobulina anti-D no período de pós-parto, significativamente reduz o risco de aloimunização materna¹⁸(A)^{13,19}(B). Todavia, recomenda-se que a administração da imunoglobulina anti-D deva ser feita assim que o resultado da tipagem sanguínea do recém-nascido esteja disponível e dentro do período de 72 horas de pós-parto²⁰(D). Nos casos em que a tipagem Rh do RN não esteja disponível até 72 horas, a imunoglobulina anti-D deve ser administrada, pois é preferível administrar desnecessariamente a imunoglobulina anti-D do que deixar de prevenir uma sensibilização²¹(D).

Apenas um estudo randomizado e de casuística pequena investigando a eficácia da administração de imunoglobulina anti-D (dose de 100 µg) em homens, depois de transcorrido 13 dias da injeção intravenosa de 1,0 ml de sangue Rh positivo demonstrou supressão da aloimunização Rh após período de seis meses²²(B).

Recomendação

A imunoglobulina anti-D administrada dentro do período de 72 horas após o parto demonstra significativa redução no risco de aloimunização em puérperas Rh negativo¹⁸(A). Em caso de omissão da administração até 72 horas existe benefício em administrá-la até 13 dias

após o parto²²(B). A administração após esse período e até o 28^o dia após o parto é baseada em consensos e opiniões de especialistas^{3,23}(D).

5. A PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-D DEVE SER SOLICITADA MENSALMENTE?

A pesquisa de anticorpos irregulares deve ser solicitada em toda primeira consulta do pré-natal²⁴(D). Nos casos em que a gestante é Rh negativo e não sensibilizada, a orientação é repetir a pesquisa de anticorpos irregulares por volta de 27 semanas, antes da administração da imunoglobulina anti-D. Quando há história de sangramento sem administração da imunoglobulina, a pesquisa de anticorpos irregulares deve ser sempre solicitada, independentemente do período da gestação, visto que pode ter ocorrido sensibilização.

Após a administração da imunoglobulina anti-D não é recomendado realizar novamente a pesquisa de anticorpos anti-D, pois a imunoglobulina administrada poderá ser detectada no sangue materno ainda por período que varia de seis a 12 semanas e não há como diferenciar se o anticorpo detectado é proveniente de resposta imune materna ou se é exógena²⁵(D). Quando há dúvida se ocorreu sensibilização da gestante previamente à administração da imunoglobulina profilática anti-D, a diferenciação seria baseada no fato de que os títulos de anti-D tenderiam a diminuir no caso de serem resultantes de imunoglobulina exógena e, quando houve sensibilização materna, os títulos permaneceriam estáveis ou aumentariam²⁵(D).

No caso de gestante já sensibilizada, a repetição dos títulos de anti-D é realizada a cada quatro semanas até a 28^a semana de gestação e

a cada duas semanas a partir desse período²⁵(D). Entretanto, após o início do tratamento fetal com transfusões intra-uterinas, os títulos de anti-D não são mais úteis para seguimento do caso.

Quando há história prévia grave (necessidade de transfusão intra-uterina, ex-sanguíneo transfusão pós-natal, perda fetal ou neonatal relacionadas à doença aloimune), os títulos de anti-D não parecem ser preditivos da gravidade da anemia fetal numa nova gestação com o mesmo parceiro²⁴(D).

Recomendação

A pesquisa de anticorpos irregulares deve ser solicitada na primeira consulta de pré-natal e, nos casos em que a gestante não é sensibilizada, deverá ser repetida com 27 semanas, antes da administração da imunoglobulina anti-D. Após a administração os títulos de anti-D não devem ser solicitados com intervalos menores do que seis semanas. No caso de gestante sensibilizada devem-se determinar os títulos de anticorpo anti-D a cada quatro semanas e, após 28 semanas, a cada duas semanas²⁴(D).

6. QUAIS SÃO OS TÍTULOS DE ANTICORPOS ANTI-D QUE REPRESENTAM RISCO DE ANEMIA PARA O FETO?

Os títulos de anticorpo anti-D são utilizados para determinar o grau de aloimunização. Eles podem ser identificados por técnicas laboratoriais altamente sensíveis, como titulação em gel. Entretanto, uma vez positivo em gel o método de reação de aglutinação com diluição em tubo é o indicado pela aplicabilidade e correlação clínica^{23,26}(D). Os métodos em gel e em tubo não apresentam resultados similares e a correlação entre os valores da titulação em gel com

a apresentação clínica não são apresentados na literatura²⁷(D). Portanto uma vez positivo o anti-D em gel, o seguimento clínico dos títulos de anti-D deve ser realizado por métodos de diluição em tubo. Correlações entre os valores obtidos em tubo com o risco de anemia fetal já foram demonstradas na literatura²⁸(C)^{23,26}(D).

Na Europa e Reino Unido, a quantidade de anticorpo anti-D circulante é relatada segundo o Padrão Internacional (UI/mL)²⁹(D). Títulos críticos são definidos como aqueles acima dos quais o feto passa a ter risco de anemia relevante do ponto de vista clínico, e o valor adotado difere segundo diferentes serviços e instituições, variando de 8 a 32. Título maior ou igual a 16 apresentam sensibilidade de 100% e especificidade de 18% para predição de anemia fetal; os respectivos valores de sensibilidade e especificidade para títulos ≥ 128 foram de 100% e 64% respectivamente³⁰(B). Segundo a referência Europeia o valor crítico seria de 4 UI/mL e valores acima de 15 UI/mL estariam correlacionados com anemia moderada ou grave³¹(B)²⁵(D).

Recomendação

Títulos de anticorpo anti-D entre 8 e 32, determinados pela técnica de diluição em tubo, estão associados com risco de anemia fetal. Estes casos devem ser encaminhados para seguimento em centros especializados em aloimunização materno-fetal.

7. O TESTE DE KLEIHauer DEVE OU NÃO SER REALIZADO?

O teste de Kleihauer-Betke é o método padrão para a detecção da hemorragia feto-materna, tendo por objetivo determinar a quantidade de imunoglobulina anti-D que uma

mulher Rh negativa deve receber, para prevenir o desenvolvimento de anticorpos ou proteínas anormais, que possam se desenvolver contra seu feto. As hemorragias feto-maternas em idades gestacionais abaixo de 20 semanas são de pequeno volume, não estando indicada a realização do teste de Kleihauer-Betke^{32(B)}^{33(D)}. Quando a idade gestacional é maior do que 20 semanas e há risco de hemorragia feto-materna de maior volume, o teste de Kleihauer-Betke deverá ser realizado. São situações consideradas de risco o trauma abdominal materno, descolamento de placenta, placenta prévia, manipulação intra-uterina, óbito fetal, gestação múltipla, remoção manual da placenta, parto cesárea e recém-nascido anêmico com suspeita de hemorragia feto-materna maciça^{32(B)}^{34(C)}^{33(D)}.

Hemorragia feto-materna excessiva é observada em aproximadamente um em cada 1.250 partos^{23(D)}. Entretanto, a presença de fatores de risco só identifica 50% destes casos^{35(B)}.

Dessa forma, o teste de Kleihauer deve ser realizado em todas as mulheres Rh negativas não sensibilizadas no pós-parto. Nos casos em que o volume de hemorragia feto-materna for superior a 4,0 ml, é necessário administrar uma dose adicional de imunoglobulina anti-D para a mãe. O cálculo da dose a ser administrada é baseado na proporção de que 20 μg de imunoglobulina neutralizam 1,0 ml de hemácias fetais.

Recomendação

O teste de Kleihauer-Betke deve ser realizado após a 20^a semana de gestação quando houver suspeita de hemorragia feto-materna de maior volume e após o parto de mulher Rh negativa não sensibilizada com recém-nascido Rh positivo^{33(D)}.

8. QUAIS SÃO OS EXAMES QUE DEVEM SER REALIZADOS APÓS A IDENTIFICAÇÃO DE TÍTULOS DE ANTICORPOS MATERNOS ELEVADOS?

Na gestante sensibilizada, os títulos dos anticorpos devem ser repetidos periodicamente. Quando atingem valores $\geq 1:16$ em técnica de diluição em tubo, há risco aumentado de anemia fetal e outros exames subsidiários devem ser solicitados. Na década de 60 foi descrito por Liley a utilização da amniocentese na predição da anemia fetal com análise da diferença de densidade óptica a 450nm (DDO450) para quantificar a bilirrubina presente no líquido amniótico em gestantes aloimunizadas^{36(D)}. Os valores de DDO450 eram plotados no gráfico de Liley que era dividido em três zonas. Neste gráfico, os valores na zona 2 superior ou 3 tinham indicação de transfusão intra-uterina. Nas décadas subsequentes, outros gráficos como de Queenan e de Bowman (Liley modificado) foram elaborados. Contudo a amniocentese apresenta risco associado de perda fetal de 0,25% a 1% e há necessidade de repetição seriada da amniocentese no seguimento destas gestantes aloimunizadas, com risco de piorar a sensibilização materna^{37(B)}^{38(D)}. Dessa forma, métodos alternativos não invasivos foram propostos para predição de anemia fetal. A amniocentese para DDO450, não é um método preconizado nos dias atuais.

Dentre os métodos não invasivos, vários parâmetros ultrassonográficos tais como sinais de hidropisia fetal, ascite, derrame pericárdico, edema de subcutâneo, tamanho do fígado, baço e dopplervelocimétricos foram avaliados. Destes, a medida da velocidade sistólica máxima da artéria cerebral média fetal se mostrou mais preditiva da

anemia fetal alterando-se rapidamente frente à hipoxemia. Além do mais, a artéria cerebral média é facilmente visibilizada, possibilitando, por conseguinte reduzida variabilidade em suas aferições tanto intra quanto interobservador. Nos fetos anêmicos, a circulação sanguínea é hiperdinâmica devido ao aumento do débito cardíaco e redução da viscosidade sanguínea, sendo relatado aumento da velocidade sistólica máxima da artéria cerebral média nos fetos anêmicos³⁹(B). Estudo analisando o pico sistólico da artéria cerebral média por meio de estudo Doppler em fetos sob risco de anemia em virtude de aloimunização materna (obtida através de histórico obstétrico, título de anticorpo materno $\geq 1:16$ ou concentração aumentada de bilirrubina em líquido amniótico detectado por espectrofotometria seriada com comprimento de onda de 450nm) e comparando com dados hematimétricos obtidos através da cordocentese, observa-se que a sensibilidade da velocidade sistólica máxima da artéria cerebral média para a predição de anemia moderada e anemia severa em fetos sem hidropisia é de 100% (IC95%: 86 a 100) com valores preditivos positivo e negativo de 65% e 100% respectivamente⁴⁰(A).

Na predição de anemia fetal, comparando a DDO 450 com a medida da velocidade sistólica máxima da artéria cerebral média, os estudos mostram sensibilidade semelhante (75 versus 75% para anemia moderada) ou até superior (88 versus 76%) da dopplervelocimetria da artéria cerebral média⁴¹(B). Todavia, é essencial rigor técnico para correta avaliação dopplervelocimétrica. O exame deve ser realizado por operadores adequadamente treinados e experientes. Contudo, este método apresenta limitações devido às elevadas taxas de falso-positivos após 34-35 semanas.

A velocidade sistólica máxima da artéria cerebral média também pode ser utilizada para seguimento e predição de anemia fetal nos casos de aloimunização contra antígenos diferentes do fator Rh, como o anti-Kell⁴²(D).

Recomendação

Nas gestantes sensibilizadas com risco aumentado de anemia fetal, recomenda-se prosseguir a investigação fetal com a realização da ultrassonografia com medida dopplervelocimétrica da velocidade sistólica máxima da artéria cerebral média.

REFERÊNCIAS

1. Robson SC, Lee D, Urbaniak S. Anti-D immunoglobulin in RhD prophylaxis. *Br J Obstet Gynaecol* 1998;105:129-34.
2. Haines P. An overview from a panel member. *Br J Obstet Gynaecol* 1998;105 Suppl 18:5-6.
3. ACOG practice bulletin. Prevention of Rh D alloimmunization. Number 4, May 1999 (replaces educational bulletin Number 147, October 1990). Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. American College of Obstetrics and Gynecology. *Int J Gynecol Obstet* 1999;66:63-70.
4. Freda VJ. Recent advances in the Rh problem. *Trans N Engl Obstet Gynecol Soc* 1964;18:91-104.
5. Zipursky A, Pollock J, Neelands P, Chown B., Israels LG. The transplacental passage of foetal red blood cells and the pathogenesis of Rh immunization during pregnancy. *Lancet* 1963;2:489-93.
6. Bergström H, Nilsson LA, Nilsson L, Ryttinger L. Demonstration of Rh antigens in a 38-day old fetus. *Am J Obstet Gynecol* 1967;99:130-3.
7. Von Stein GA, Munsick RA, Stiver K, Ryder K. Fetomaternal hemorrhage in threatened abortion. *Obstet Gynecol* 1992;79:383-6.
8. Hannafin B, Lovecchio F, Blackburn P. Do Rh-negative women with first trimester spontaneous abortions need Rh immune globulin? *Am J Emerg Med* 2006;24:487-9.
9. Visscher RD, Visscher HC. Do Rh-negative women with and early spontaneous abortion need Rh immune prophylaxis? *Am J Obstet Gynecol* 1972;1972:158-65.
10. Matthews CD, Matthews AE. Transplacental haemorrhages in spontaneous and induced abortion. *Lancet* 1969;1:694-5.
11. Stockman JA 3rd. Overview of the state of the art of Rh disease: history, current clinical management, and recent progress. *J Pediatr Hematol Oncol* 2001;23:385-93.
12. Bowman JM, Pollock JM. Antenatal prophylaxis of Rh isoimmunization: 28-weeks-gestation service program. *Can Med Assoc J* 1978;118:627-30.
13. Tovey LA, Townley A, Stevenson BJ, Taverner J. The Yorkshire antenatal anti-D immunoglobulin trial in primigravidae. *Lancet* 1983;2:244-6.
14. Thornton JG, Page C, Foote G, Arthur GR, Tovey LA, Scott JS. Efficacy and long term effects of antenatal prophylaxis with anti-D immunoglobulin. *BMJ* 1989;298:1671-3.
15. Huchet J, Dallemagne S, Huchet CL, Brossard Y, Larsen M, Parnet-Mathieu F. Ante-partum administration of preventive treatment of Rh-D immunization in rhesus-negative women. Parallel evaluation of transplacental passage of fetal blood cells. Results of a multicenter study carried out

- in the Paris region. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 1987;16:101-11.
16. Lee D, Rawlinson VI. Multicentre trial of antepartum low-dose anti-D immunoglobulin. *Transfus Med* 1995;5:15-19.
17. MacKenzie IZ, Bowell P, Gregory H, Pratt G, Guest C, Entwistle CC. Routine antenatal Rhesus D immunoglobulin prophylaxis: the results of a prospective 10 year study. *Br J Obstet Gynaecol* 1999;106:492-7.
18. Crowther C, Middleton P. Anti-D administration after childbirth for preventing Rhesus alloimmunisation. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000;(2):CD000021.
19. Kornstad L. Fifteen years' experience with post-partum Rh prophylaxis in Norway (1969-83): incidence of new cases of anti-D and other clinically important blood group antibodies in pregnant women. *NIPH Ann* 1987;10:3-10.
20. Fung Kee Fung K, Eason E, Crane J, Armonson A, De La Ronde S, et al. Prevention of Rh alloimmunization. *J Obstet Gynaecol Can* 2003;25:765-73.
21. Bowman J. Thirty-five years of Rh prophylaxis. *Transfusion* 2003;43:1661-6.
22. Samson D, Mollison PL. Effect on primary Rh-immunization of delayed administration of anti-Rh. *Immunology* 1975;28:349-57.
23. Bowman JM. Controversies in Rh prophylaxis. Who needs Rh immune globulin and when should it be given? *Am J Obstet Gynecol* 1985;151:289-94.
24. Moise KJ. Management of Rhesus Alloimmunization in Pregnancy. *Obstet Gynecol* 2008;112:164-76.
25. British Committee for Standards in Haematology Blood Transfusion Task Force, Gooch A, Parker J, Wray J, Qureshi H. Guideline for blood grouping and antibody testing in pregnancy. *Transfus Med* 2007;17:252-62.
26. ACOG Practice Bulletin. Management of Alloimmunization During Pregnancy. *Obstet Gynecol* 2006;108:457-67.
27. Novaretti MC, Jens E, Pagliarini T, Bonifácio SL, Dorlhiac-Laacer PE, Chamone DA. Comparison of conventional tube test with diamed gel microcolumn assay for anti-D titration. *Clin Lab Haem* 2003;25:311-5.
28. Bowman JM, Pollock JM. Amniotic fluid spectrophotometry and early delivery in the management of erythroblastosis fetalis. *Pediatrics* 1965;35:815-35.
29. Contreras M, Garner SF, de Silva M. Prenatal testing to predict the severity of haemolytic disease of the fetus and newborn. *Curr Opin Hematol* 1996;3:480-4.
30. Moise KJ Jr, Perkins JT, Sosler SD, Brown SJ, Saade G, Carpenter RJ Jr, et al. The predictive value of maternal serum testing for detection of fetal anemia in red blood cell alloimmunization. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:1003-9.

31. Nicolaides KH, Rodeck CH. Maternal serum anti-D antibody concentration and assessment of rhesus isoimmunisation. *BMJ* 1992;304:1155-6.
32. Bowman JM, Pollock JM, Penston LE. Fetomaternal transplacental haemorrhage during pregnancy and after delivery. *Vox Sang* 1986;51:117-21.
33. The estimation of fetomaternal haemorrhage. BCSH Blood Transfusion and Haematology Task Forces. *Transfus Med* 1999;9:87-92.
34. Koelewijn JM, de Haas M, Vrijkotte TG, van der Schoot CE, Bonsel GJ. Risk factors for RhD immunisation despite antenatal and postnatal anti-D prophylaxis. *BJOG* 2009;116:1307-14.
35. Ness PM, Baldwin ML, Niebyl JR. Clinical high-risk designation does not predict excess fetal-maternal hemorrhage. *Am J Obstet Gynecol* 1987;156:154-8.
36. Liley AW. Liquor amni analysis in the management of pregnancy complicated by rhesus sensitization. *Am J Obstet Gynecol* 1961;82:1359-70.
37. Tabor A, Philip J, Madsen M, Bang J, Obel EB, Norgaard-Pedersen B. Randomised controlled trial of genetic amniocentesis in 4606 low-risk women. *Lancet* 1986;1:1287-93.
38. Bowman JM. The management of Rh-isoimmunization. *Obstet Gynecol* 1978;52:1-16.
39. Mari G, Andrignolo A, Abuhamad AZ, Pirhonen J, Jones DC, Ludomirsky A, et al. Diagnosis of fetal anemia with Doppler ultrasound in the pregnancy complicated by maternal blood group immunization. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1995;5:400-5.
40. Mari G, Deter RL, Carpenter RL, Rahman F, Zimmerman R, Moise KJ Jr, et al. Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. Collaborative Group for Doppler Assessment of the Blood Velocity in Anemic Fetuses. *N Engl J Med* 2000;342:9-14.
41. Nishie EN, Brizot ML, Liao AW, Carvalho MH, Toma O, Zugaib M. A comparison between middle cerebral artery peak systolic velocity and amniotic fluid optical density at 450nm in the prediction of fetal anemia. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:214-9.
42. Oepkes D. Invasive versus non-invasive testing in red-cell alloimmunized pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000;92:83-9.