

Genotipificación del gen *RHD* en ADN fetal libre en plasma de embarazadas RhD negativo

Genotyping of the *RHD* gene in free fetal DNA in plasma of RhD negative pregnant women

María A. Núñez-Ahumada^{1*}, Fernando Pontigo-González¹, Sergio Farías-Peñailillo¹,
Cristian Villalobos-Pavez¹, Edgardo Saa-Díaz¹, Andrea Canals-Cifuentes² e Iván Rojas-Tapia³

¹Banco de Sangre; ²Dirección Académica; ³Servicio de Obstetricia y Ginecología. Clínica Santa María, Comuna de Providencia, Santiago, Chile

Resumen

Objetivo: Determinar el grupo RhD fetal a través del estudio del gen *RHD* en ADN fetal que se encuentra libre en plasma de embarazadas RhD negativo. **Método:** Se analizó la presencia de los genes *RHD*, *SRY* y *BGLO* en ADNf obtenido de plasma de 51 embarazadas RhD negativo no sensibilizadas, utilizando una qPCR. Los resultados del estudio genético del gen *RHD* se compararon con el estudio del grupo sanguíneo RhD realizado por método serológico en muestras de sangre de cordón, y los resultados del estudio del gen *SRY* fueron cotejados con el sexo fetal determinado por ecografía. Se calcularon la sensibilidad, la especificidad, los valores predictivos y la capacidad discriminativa del método estandarizado. **Resultados:** El gen *RHD* estaba presente en el 72,5% de las muestras y el gen *SRY* en el 55,5%, coincidiendo en un 100% con los resultados del grupo RhD detectado en sangre de cordón y con el sexo fetal confirmado por ecografía, respectivamente. **Conclusiones:** Fue posible deducir el grupo sanguíneo RhD del feto mediante el estudio del ADN fetal que se encuentra libre en el plasma de embarazadas con un método molecular no invasivo desarrollado y validado para este fin. Este test no invasivo puede ser utilizado para tomar la decisión de administrar inmunoglobulina anti-D solo a embarazadas RhD negativo que portan un feto RhD positivo.

Palabras clave: Inmunoglobulina anti-D. Enfermedad hemolítica fetal y del recién nacido. ADN fetal libre. Gen *RHD*. Gen *SRY*.

Abstract

Objective: To determine the fetal RhD group through the study of the *RHD* gene in fetal DNA found free in plasma of RhD negative pregnant women. **Method:** The presence of the *RHD*, *SRY* and *BGLO* genes in fetal DNA obtained from plasma of 51 non-sensitized RhD negative pregnant women was analyzed using qPCR. The results of the genetic study of the *RHD* gene were compared with the RhD blood group study performed by serological method in cord blood samples, and the results of the *SRY* gene study were compared with the fetal sex determined by ultrasound. Sensitivity, specificity, predictive values and discriminative capacity of the standardized method were calculated. **Results:** The *RHD* gene was present in 72.5% of the samples and the *SRY* gene in 55.5%, coinciding 100% with the results of the RhD group detected in cord blood, and with the fetal sex confirmed by ultrasound, respectively. **Conclusions:** It was possible to deduce the RhD blood group of the fetus through the study of fetal DNA found free in the plasma of pregnant women with a non-invasive molecular method developed and validated for this purpose. This non-invasive test can be used to make the decision to administer anti-D immunoglobulin only to RhD-negative pregnant women carrying an RhD-positive fetus.

Keywords: Anti-D immunoglobulin. Fetal and newborn hemolytic disease. Free fetal DNA. *RHD* gene. *SRY* gene.

*Correspondencia:

María A. Núñez-Ahumada
E-mail: antonieta.tm@gmail.com

Fecha de recepción: 22-11-2022

Fecha de aceptación: 12-04-2023

DOI: 10.24875/RECHOG.22000106

Disponible en internet: 12-07-2023

Rev Chil Obstet Ginecol. 2023;88(3):138-142

www.rechog.com

0048-766X / © 2023 Sociedad Chilena de Obstetricia y Ginecología. Publicado por Permanyer. Este es un artículo open access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

El mayor avance de las últimas décadas en el diagnóstico prenatal ha sido la demostración que realizaron Lo et al.¹, en el año 1997, de la existencia de secuencias de ADN fetal libre (ADNfl) en plasma de mujeres embarazadas en cantidades significativamente más altas que las que se podían obtener de células fetales. El ADNfl es liberado durante el embarazo desde la placenta a la circulación materna en la medida en que los citotrofoblastos y los sincitiotrofoblastos se exponen a ciclos de fusión y apoptosis².

Una de las aplicaciones clínicas de este conocimiento en el diagnóstico prenatal es la detección del gen *RHD* del feto en el ADNfl en el plasma de embarazadas RhD negativo³. El mecanismo genético más común que subyace al fenotipo RhD negativo corresponde a una delección total homocigota del gen *RHD*, y por lo tanto, al utilizar partidores y sondas específicos para este gen en una madre RhD negativo con feto RhD positivo, se va a amplificar solo el gen *RHD* del feto, ya que la madre carece de este. No obstante lo anterior, se debe tener en cuenta que existen mecanismos moleculares, no descritos aún en chilenos, que producen un fenotipo RhD negativo en los que el gen está presente pero por mecanismos genéticos de delección y conversión génica no se expresan; estos son característicos de población afrodescendiente.

Las embarazadas RhD negativo portadoras de un feto RhD positivo pueden generar aloanticuerpos que traspasan la placenta, se unan a los glóbulos rojos fetales y produzcan hemólisis, desencadenando una serie de eventos que en su conjunto producen la enfermedad hemolítica fetal y del recién nacido (EHFRN), la cual en los casos más extremos puede producir un hidrops fetal y la muerte⁴.

Para prevenir la aloinmunización durante la gestación y la EHFRN por incompatibilidad de grupo sanguíneo RhD se recomienda la administración de inmunoglobulina (Ig) anti-D (Rhogam) a las embarazadas RhD negativo entre las 26 y 28 semanas de gestación, y en el momento del nacimiento si el recién nacido es RhD positivo^{4,5}. La inmunoprofilaxis se realiza en todas las embarazadas, pero se ha descrito que un tercio de las gestantes RhD negativo son portadoras de un feto RhD negativo, y se exponen al riesgo de recibir un compuesto de origen humano sin necesitarlo, lo que genera un gasto innecesario además de cuestionamientos médicos y éticos en relación con esta práctica cuando existe la posibilidad de conocer el grupo RhD del feto en forma segura^{6,7}.

La Ig anti-D se obtiene de plasma humano, por lo que se debe considerar como un hemocomponente que durante el proceso de elaboración es sometido a la inactivación de microorganismos. Sin embargo, hasta el día de hoy, no todos los patógenos pueden ser inactivados sin afectar la calidad de los hemocomponentes, como es el caso del parvovirus B19. La infección por parvovirus B19 durante el embarazo puede causar hidrops fetal, aborto espontáneo, anemia fetal y muerte fetal intrauterina. Por ello, si bien el riesgo infeccioso es mínimo, se mantiene, exponiendo a las embarazadas en cada profilaxis administrada⁸. En consecuencia, la detección del gen *RHD* en ADNfl aumenta la seguridad de las pacientes con esta condición, dado que los esfuerzos de prevención y monitoreo para prevenir la EHFRN se centran exclusivamente en las embarazadas que portan un feto RhD positivo. Por otra parte, conocer el grupo RhD del feto permite que la familia y el médico tratante estén alerta en caso de un feto RhD positivo y saquen del grupo de riesgo a las embarazadas con un feto RhD negativo.

Debido a que el ADNfl es lábil y está en baja concentración (3% del ADN libre total), y a que no existen hasta el momento técnicas en laboratorios de Chile que lo utilicen en métodos diagnósticos, nuestro primer objetivo fue implementar, estandarizar y validar una técnica *in house* que permitiera la detección del gen *RHD* en ADNfl en plasma de embarazadas RhD negativo atendidas en el servicio de obstetricia de nuestra institución, y con esta información poder deducir el grupo RhD del feto con el propósito de administrar Ig anti-D solo a las embarazadas portadoras de un feto RhD positivo. Un objetivo adicional fue la determinación del sexo fetal mediante la amplificación del gen *SRY* del cromosoma Y, que sirve como control de la presencia de ADNfl.

Método

El proyecto fue aprobado por el Comité Ético Científico de la institución donde se realizó el estudio, y financiado con fondos obtenidos en el Concurso de Investigación interna realizado por la Dirección Académica de la misma.

Cálculo del tamaño muestral

Para estimar la sensibilidad y la especificidad del método se calculó el tamaño muestral utilizando una potencia del 80%, un nivel de confianza del 95% y un

error del 5%, obteniendo un tamaño de muestra mínimo de 14 embarazadas RhD negativo con feto RhD negativo y 14 embarazadas RhD negativo con feto RhD positivo.

Extracción del ADNf

Se realizó con el QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit, de QIAGEN, específico para la extracción de ADNf en plasma.

Método de detección

La detección se realizó por el método de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR, *quantitative polymerase chain reaction*) *in house*, y se analizó la presencia de los genes *RHD*, *SRY* y *BGLO* utilizando sondas Taqman y partidores con secuencias específicas (Tabla 1). El gen *BGLO* es un gen constitutivo utilizado como control interno para probar la presencia de ADN.

Las muestras se analizaron por triplicado para los tres genes, incluyendo un control positivo y un control negativo también por triplicado para cada gen; en total, por cada muestra se realizaron 27 determinaciones.

Fenotipo neonatal y sexo fetal

Los resultados obtenidos en ADNf del gen *RHD* se compararon con los fenotipos RhD obtenidos por técnica serológica en las muestras de sangre de cordón de los recién nacidos, y los resultados de la detección del gen *SRY* fueron cotejados con el sexo fetal determinado por ecografía.

Análisis estadísticos

Se calcularon la sensibilidad, la especificidad, los valores predictivos y la capacidad discriminativa de cada método con el software STATA 13.

Resultados

Estandarización y validación del método

Se obtuvieron 51 muestras provenientes de embarazadas RhD negativo atendidas en el servicio de obstetricia y ginecología de la institución. Las embarazadas tuvieron una edad promedio de 33 años y un promedio de 25 semanas de embarazo (mínimo 13 semanas y máximo 33 semanas). Las multiparas no estaban sensibilizadas.

Tabla 1. Partidores y sondas utilizadas en la qPCR

Gen	Nombre	Secuencia (5'a 3')
<i>RHD</i>	Sonda	(FAM)-TA CGT GAG AAA CGC TCA TGA CAG CAA AGT CT-(BHQ-1)
	Partidor Forward	CCT CTC ACT GTT GCC TGC ATT
	Partidor Reverse	AGT GCC TGC GCG AAC ATT
<i>BGLO</i>	Sonda	(FAM)-AA GGT GAA CGT GGA TGA AGT TGG TGG-(BHQ-1)
	Partidor Forward	GTG CAC CTG ACT CCT GAG GAG
	Partidor Reverse	CCT TGA TAC CAA CCT GCC CAG
<i>SRY</i>	Sonda	(FAM)-AG CAG TAG AGC AGT CAG GGA GGC AGA-(BHQ-1)
	Partidor Forward	TGG CGA TTA AGT CAA ATT CGC
	Partidor Reverse	CCC CCT AGT ACC CTG ACA ATG TATT

Tabla 2. Clasificación de los resultados de los genes *RHD* y *SRY* en ADNf

Interpretación de los resultados	
Gen <i>RHD</i>	
Positivo	Promedio Ct < 39
Zona gris	Promedio Ct entre 39 y 40
Negativo	Promedio Ct > 40 o ≥ 2 valores indeterminados
Gen <i>SRY</i>	
Positivo	Promedio Ct < 39
Zona gris	Promedio Ct entre 39 y 40
Negativo	Promedio Ct > 40 o ≥ 2 valores indeterminados.

Ct: *cycle threshold* (ciclo umbral).

La clasificación utilizada para interpretar los resultados del estudio por qPCR de los genes *RHD* y *SRY* se muestra en la tabla 2.

Los resultados de la detección de los genes *RHD* y *SRY* en ADNf, así como los resultados de los fenotipos RhD determinados en sangre de cordón de los recién nacidos y del sexo determinado por ecografía, se muestran en la tabla 3.

Los resultados del análisis de los genes *RHD* y *SRY* obtenidos por el método molecular utilizando ADNf mostraron una coincidencia del 100% con los resultados del estudio de los fenotipos RhD realizados en sangre de cordón de los recién nacidos, y con la confirmación

Tabla 3. Resultados de la medición de los genes *RHD* y *SRY* en ADNfl, fenotipo RhD en sangre de cordón y sexo fetal por ecografía en las 51 embarazadas que participaron en el estudio

Comparación de métodos	Detección molecular del gen <i>RHD</i> vs. fenotipo RhD por método serológico				Detección molecular del gen <i>SRY</i> vs. sexo fetal por ecografía			
	Gen <i>RHD</i> en ADNfl		Fenotipo RhD en sangre de cordón		Gen <i>SRY</i> en ADNfl		Sexo fetal por ecografía	
Parámetro evaluado	Gen <i>RHD</i> en ADNfl		Fenotipo RhD en sangre de cordón		Gen <i>SRY</i> en ADNfl		Sexo fetal por ecografía	
n (%)	37 (72,5)	14 (27,5)	37 (72,5)	14 (27,5)	29 (56,9)	23 (43,1)	29 (56,9)	23 (43,1)
Resultado observado	+	-	+	-	+	-	Masculino	Femenino

del sexo fetal por la ecografía, respectivamente. Por esto, tanto para la determinación en ADNfl del gen *RHD* como para el gen *SRY* se obtuvo una sensibilidad, una especificidad y unos valores predictivos positivo y negativo del 100%.

Con los valores de Ct (*cycle threshold* [ciclo umbral]) obtenidos de la qPCR, utilizados para considerar un resultado positivo o negativo, se obtuvo la curva ROC (*receiver operating characteristic*) para evaluar la capacidad discriminativa de cada método (detección de genes *RHD* y *SRY* en ADNfl). El área bajo la curva ROC (AUC) representa la capacidad predictiva de la técnica, y para ambos casos se obtuvo un AUC del 100%. El intervalo de confianza para ambas AUC fue del 93% y del 100%.

Discusión

El estudio en ADNfl de los genes *RHD* y *SRY* fetales presentes en el plasma de embarazadas RhD negativo es una prueba prenatal no invasiva que evita la administración de Ig anti-D a mujeres portadoras de un feto RhD negativo, proporcionando una mejor atención a este grupo de gestantes, previniendo el riesgo infeccioso de la vacuna, otorgando tranquilidad a los padres y al equipo médico tratante de la gestante, y disminuyendo los gastos económicos de la familia. De la misma forma, el análisis confirma el riesgo de EHFRN en gestantes con feto RhD positivo, permitiendo estar preparados si se requieren procedimientos más invasivos, como es el caso de transfusiones intrauterinas o exanguinotransfusiones, lo que es relevante especialmente en mujeres aloimmunizadas. Sumado a lo anterior, la administración de inmunoprofilaxis anti-D solo en pacientes que la requieren contribuye a gestionar de mejor forma el cada vez más reducido stock de Ig anti-D.

Además de los beneficios clínicos y prácticos de este examen, determinar el grupo sanguíneo del feto estudiando el ADNfl en el plasma de embarazadas permite administrar la Ig anti-D solo a embarazadas con un feto

RhD positivo, eliminando el cuestionamiento ético que surge cuando se administra la profilaxis a embarazadas con feto RhD negativo que no la requieren. Kent et al.⁷ evaluaron si es éticamente aceptable administrar Ig anti-D a todas las embarazadas RhD negativo cuando está disponible el examen para determinar el gen *RHD* en ADNfl, y concluyeron que si se ofreciera el examen a todas las mujeres embarazadas RhD negativo ayudaría a que estas pudieran tomar una decisión informada sobre la conveniencia de recibir o no Ig anti-D prenatal, eliminando el conflicto ético.

La sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos positivo y negativo, en la validación del método implementado para la detección del gen *RHD* y del gen *SRY*, fueron del 100% utilizando muestras de embarazadas desde la semana 13 de embarazo.

Dentro de las fortalezas de este estudio se encuentran que es un examen no invasivo y que el desarrollo de la técnica *in house* permite disminuir los costos, haciendo económicamente accesible este análisis a las pacientes que lo requieran. Las debilidades incluyen que se requieren profesionales entrenados en biología molecular e inmunohematología para realizar el examen e interpretar el resultado, y que en esta etapa no se incluyó la detección de genes inactivos.

Para implementar la técnica en todo el país es importante primero definir y planificar en qué bancos de sangre se realizará, tomando en cuenta los recursos disponibles, la infraestructura y la formación de profesionales en biología molecular de grupos sanguíneos. Probablemente, la estrategia más costo-eficiente sea implementar el método en bancos de sangre de referencia, públicos o privados, a lo largo del país, a los que se deriven las muestras de otros centros.

Debido a las ventajas expuestas de seguridad, indicación correcta, confirmación diagnóstica y uso racional de profilaxis, es recomendable realizar este examen, cuando los recursos lo permitan, a todas las embarazadas RhD negativo y administrar Ig anti-D solo a aquellas RhD negativo con feto RhD positivo.

Los resultados de este estudio y los de su posterior aplicación clínica representan un gran avance, en especial en el manejo de las mujeres RhD negativo inmunizadas.

Conclusiones

Se implementó y validó un método molecular para detectar el gen *RHD* en ADNfl en plasma materno, que mostró una sensibilidad, una especificidad y unos valores predictivos positivo y negativo adecuados para ser utilizado como un examen de diagnóstico. Esta información permite conocer el grupo RhD fetal sin necesidad de obtener sangre fetal mediante un método invasivo.

Este examen puede ser ofrecido a todas las embarazadas RhD negativo, otorgándoles así la posibilidad de conocer el grupo RhD de su hijo y recibir Ig anti-D solo si es necesario.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dirección Académica de Clínica Santa María por financiar este proyecto, a la Dirección Médica por apoyar la innovación, y a los médicos ginecólogos obstetras que participaron en el proyecto.

Financiamiento

Fondos obtenidos en el Concurso de Investigación interna realizado por la Dirección Académica de la Clínica Santa María.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Bibliografía

1. Lo YD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997;350:485-7.
2. Bianchi DW, Chiu RW. Sequencing of circulating cell-free DNA during pregnancy. *N Engl J Med*. 2018;379:464-73.
3. Manfroi S, Calisesi C, Fagiani P, Gabriele A, Lodi G, Nucci S, et al. Prenatal non-invasive fetal RHD genotyping: diagnostic accuracy of a test as a guide for appropriate administration of antenatal anti-D immunoprophylaxis. *Blood Transfus*. 2018;16:514-24.
4. Insunza A, Behnke E, Carrillo J. Enfermedad hemolítica perinatal: manejo de la embarazada RhD negativo. *Rev Chil Obstet Ginecol*. 2011;76:188-206.
5. Teitelbaum L, Metcalfe A, Clarke G, Parboosingh JS, Wilson RD, Johnson JM. Costs and benefits of non invasive fetal RhD determination. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015;45:84-8.
6. Clausen FB, Barrett AN, Krog GR, Finning K, Dziegiel MH. Non-invasive foetal RhD genotyping to guide anti-D prophylaxis: an external quality assurance workshop. *Blood Transfus*. 2018;16:359.
7. Kent J, Farrell AM, Soothill P. Routine administration of anti-D: the ethical case for offering pregnant women fetal RHD genotyping and a review of policy and practice. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2014;14:87.
8. Dicuatro N, Ortiz E, Boggio GA, Resino C, Melideo C, Miranda MT, et al. Reporte de un caso de hidropesía fetal no inmune. Importancia de la pesquisa de infección por parvovirus B19 en embarazadas para un diagnóstico oportuno. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba*. 2021;78(Suplemento). Disponible en: <https://revistas.unc.edu.ar/index.php/med/article/view/34879>