

GENOTIPADO DEL RhD FETAL: DE LA BASE GENÉTICA A LA DETERMINACIÓN MOLECULAR

Introducción

El sistema Rh es uno de los grupos sanguíneos eritrocitarios más importantes desde el punto de vista clínico. Dentro de este sistema, el antígeno D es especialmente relevante por su elevada inmunogenicidad. La presencia o ausencia de este antígeno determina, de manera simplificada, si una persona es RhD positiva o RhD negativa.

Durante el embarazo, la incompatibilidad RhD entre la madre y el feto puede tener consecuencias clínicas cuando una gestante RhD negativa entra en contacto con hematíes fetales que expresan el antígeno D. Este contacto puede producir una aloinmunización materna, con formación de anticuerpos anti-D que pueden atravesar la placenta y reaccionar contra los eritrocitos fetales.

La posibilidad de determinar el RhD fetal durante el embarazo a partir de una muestra de sangre materna ha representado un importante avance en este ámbito. Esta determinación es posible gracias a la presencia de DNA fetal libre circulante (cell-free fetal DNA, cffDNA) en el plasma materno, que permite estudiar determinadas características genéticas del feto sin necesidad de obtener una muestra fetal mediante una técnica invasiva.

Base genética del sistema RhD

Los principales genes responsables de los antígenos del sistema Rh se encuentran en el brazo corto del cromosoma 1 y son los genes *RHD* y *RHCE*. Ambos genes se encuentran muy próximos y presentan una elevada homología de secuencia, ya que proceden de la duplicación de un gen ancestral común.

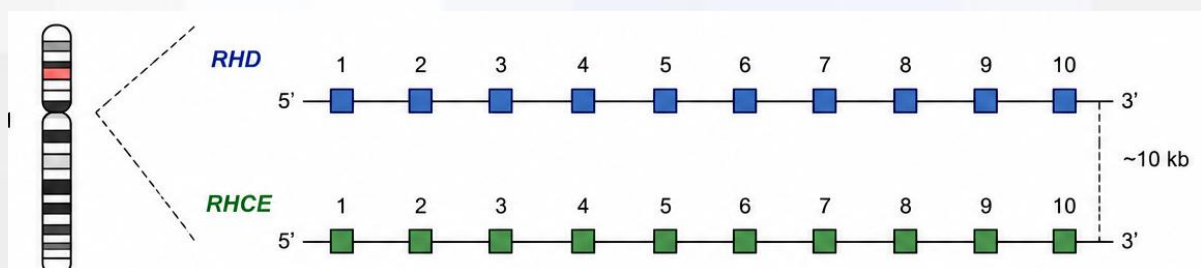
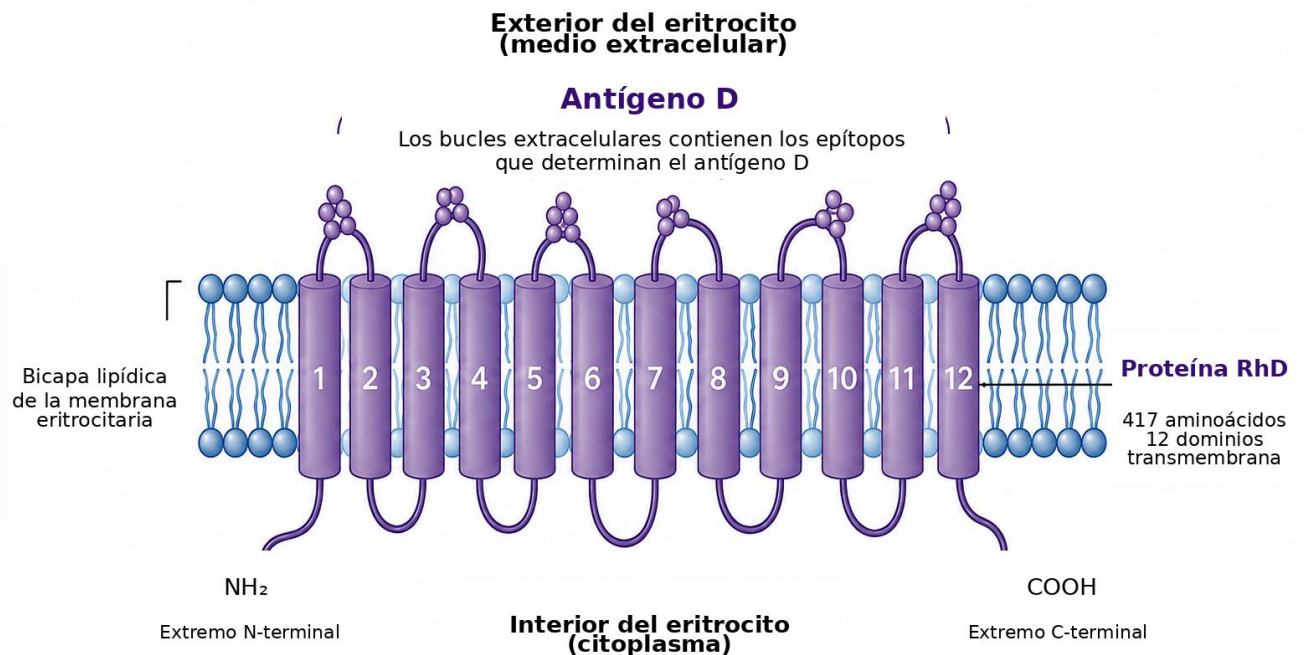


Figura 1. Localización de los genes *RHD* y *RHCE* en el brazo corto del cromosoma 1 (1p36.11) y organización en 10 exones.

Fuente: elaboración propia a partir de NCBI. The Rh blood group. Blood Groups and Red Cell Antigens. NCBI Bookshelf.

Catlab Informa

El gen *RHD* codifica la proteína RhD, una proteína transmembrana de 417 aminoácidos que atraviesa la membrana del eritrocito en 12 segmentos transmembrana. RhD forma parte del complejo Rh de la membrana eritrocitaria y es la proteína que porta el antígeno D, uno de los antígenos más inmunógenos de los grupos sanguíneos. Su estructura presenta diversos segmentos transmembrana y bucles extracelulares, que contribuyen a configurar las regiones de la proteína expuestas en la superficie celular y que participan en la determinación de los diferentes epítomos del antígeno D.



RhD forma parte del complejo Rh de la membrana eritrocitaria y se asocia con otras proteínas del complejo (p. ej., RhCE, RhAG) para una correcta estabilidad y función de la membrana.

Figura 2. Proteína RhD en la membrana eritrocitaria.

Fuente: elaboración propia a partir de Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. *Blood*. 2000;95(2):375–387.

La estrecha homología entre *RhD* y *RhCE* es especialmente relevante desde el punto de vista molecular, ya que los procesos de recombinación y conversión génica entre *RHD* y *RHCE* pueden originar genes híbridos y variantes del antígeno D, como los fenotipos weak D y partial D.

RhD positivo y RhD negativo

En la población europea, la causa molecular más frecuente del fenotipo RhD negativo es la delección completa del gen *RHD*. Esta delección está relacionada con procesos de recombinación homóloga entre regiones altamente similares que flanquean el gen, conocidas como Rhesus boxes.

Catlab Informa

Sin embargo, no todos los fenotipos RhD negativos son consecuencia de la delección completa de *RHD*. Existen numerosas variantes del gen que pueden alterar la expresión del antígeno D, incluidas variantes weak D, partial D, variantes DEL y genes híbridos *RHD-RHCE*. Esta diversidad genética es uno de los principales retos del genotipado molecular del RhD.

El DNA fetal libre circulante

Durante el embarazo, una pequeña proporción del DNA libre que circula por el plasma materno procede del feto. Este DNA fetal libre circulante procede principalmente de la placenta y se encuentra mezclado con una cantidad mucho mayor de DNA libre de origen materno.

Esto permite aprovechar una característica genética fundamental: si la madre es RhD negativa y no presenta el gen *RHD* funcional, la detección de secuencias específicas de *RHD* en el plasma materno puede indicar la presencia de DNA fetal procedente de un feto portador de *RHD*.

De este modo, mediante una muestra de sangre materna, es posible analizar indirectamente el gen *RHD* fetal durante el embarazo. Esta aproximación constituye una de las aplicaciones clínicas más consolidadas del diagnóstico prenatal no invasivo basado en DNA libre circulante.

Genotipado fetal del RhD en Catlab

De la sangre materna al DNA fetal

La determinación del genotipo RhD fetal se realiza en las gestantes RhD negativas a partir de una muestra de sangre materna recogida en un tubo de EDTA de 10 mL. A partir de esta muestra se obtiene el plasma, que contiene DNA fetal libre circulante (cffDNA), que es el material genético que se analizará.

En Catlab, el plasma se separa mediante centrifugación y se conserva aproximadamente a -80 °C hasta el momento de la extracción. Posteriormente, el DNA se extrae de forma semiautomatizada con el sistema QIAcube, utilizando el kit QIAamp MinElute ccfDNA Mini Kit.

Detección molecular del genotipo RhD fetal

El cffDNA extraído se analiza con el kit FastQ® RHD fetal. La metodología se basa en una PCR específica de alelo (PCR-SSP) con detección de la amplificación mediante PCR en tiempo real.

La reacción permite analizar tres regiones específicas del gen *RHD*: los exones 5, 7 y 10. Cada muestra se procesa por triplicado, de modo que se obtienen hasta nueve detecciones específicas por muestra.

Catlab Informa

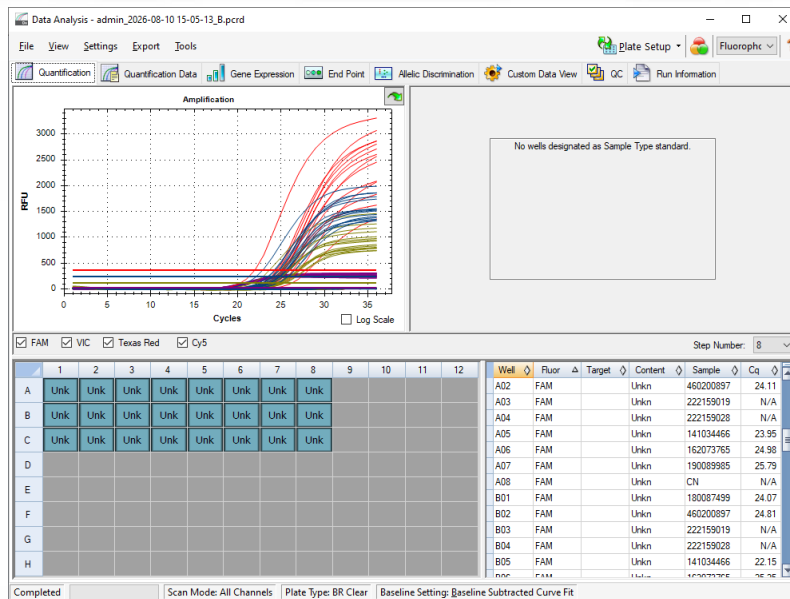


Figura 3. Ejemplo de curvas de amplificación obtenidas con el sistema CFX96 durante el genotipado RhD fetal.

Cada diana molecular se detecta mediante un fluoróforo específico: el exón 5 se detecta en el canal FAM, el exón 7 en VIC y el exón 10 en Texas Red. La reacción incorpora, además, un control interno de amplificación (IAC), asociado al gen humano HCG, que se detecta en el canal Cy5.

Para la interpretación de los resultados, las amplificaciones específicas se consideran positivas cuando presentan un valor de $Cq \leq 30$. El control interno permite comprobar que la reacción contiene DNA humano amplificable.

Especificidad	Fluoróforo	Criterio
Control interno de amplificación (IAC)	Cy5	$Cq \leq 30$
Exó 5	FAM	$Cq \leq 30$
Exó 7	VIC	$Cq \leq 30$
Exó 10	Texas Red	$Cq \leq 30$

Cada serie analítica incorpora un control negativo (NTC) con agua destilada, que permite controlar posibles contaminaciones. En condiciones adecuadas, el control negativo no debe mostrar señal de fluorescencia dentro de los valores de Cq establecidos.

La interpretación también tiene en cuenta los posibles artefactos de PCR, especialmente en el canal Cy5 de los controles negativos, que pueden aparecer como señales tardías y requieren una valoración conjunta con el resto de resultados del run.

Catlab Informa

Interpretación del genotipo RhD fetal

La determinación se basa en el número de detecciones específicas positivas obtenidas entre las nueve posibles combinaciones (tres exones analizados por triplicado).

La interpretación no se basa únicamente en el número total de señales positivas. La distribución de las señales entre los exones 5, 7 y 10 aporta información adicional. Los patrones de detección discordantes entre estos exones pueden estar relacionados con variantes del gen *RHD*, como genes híbridos *RHD-RHCE*, variantes weak D o parcial D, y pueden dar lugar a resultados no valorables.

Patrón de detección	Interpretación	Actuación / resultado
≥ 4 de las 9 detecciones específicas positivas	Genotipo RHD fetal positivo	Resultado positivo.
1–2 de las 9 detecciones específicas positivas	Genotipo RHD fetal negativo	Si la gestación es ≤20 semanas, se debe repetir el estudio a partir de la semana 20.
3 detecciones positivas o patrón discordante entre los exones 5, 7 y 10	Resultado no valorable	Repetir el estudio y realizar una valoración específica del patrón.
Ningún exón específico detectado	Genotipo RHD fetal negativo	Resultado negativo, siempre que los controles sean válidos.
Control interno (Cy5) ausente / reacción inhibida	Resultado inválido	Reacción no interpretable; es necesario repetir el estudio.

Todos los resultados no valorables se repiten. Si, después de la repetición, el resultado continúa siendo no valorable, el manejo de la gestación es el de un posible feto RhD+, por prudencia obstétrica.

El genotipado fetal del RhD en gestantes RhD negativas, a partir de DNA fetal libre circulante, permite determinar si el feto es RhD positivo o negativo mediante una simple muestra de sangre materna, sin necesidad de procedimientos invasivos. Esta determinación aporta información relevante para la gestión del embarazo y permite adaptar la profilaxis anti-D a las necesidades de cada gestante, contribuyendo a una atención más precisa, segura y personalizada.

Jordi Roigé
Facultatiu de la secció de Genètica
CATLAB
jroige@catlab.cat
www.catlab.cat

Catlab Informa

Bibliografía

1. BAG Diagnostics GmbH. FastQ® RHD fetal. Instructions for Use. IFU-FastQ-RHD-fetal-V4-2024-EN.
 2. Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. *Blood*. 2000;95(2):375-387. doi:10.1182/blood.V95.2.375.
 3. Floch A. Molecular genetics of the Rh blood group system: alleles and antibodies— a narrative review. *Annals of Blood*. 2021. doi:10.21037/aob-20-84.
 4. Clausen FB, van der Schoot CE. Noninvasive fetal blood group antigen genotyping. *Blood Transfusion*. 2025;23(2). doi:10.2450/BloodTransfus.712.
 5. National Center for Biotechnology Information (NCBI). The Rh blood group. *Blood Groups and Red Cell Antigens*. NCBI Bookshelf.
-