

GENOTIPATGE DEL RhD FETAL: DE LA BASE GENÈTICA A LA DETERMINACIÓ

Introducció

El sistema Rh és un dels grups sanguinis eritrocitaris més importants des del punt de vista clínic. Dins d'aquest sistema, l'antigen D és especialment rellevant per la seva elevada immunogenicitat. La presència o absència d'aquest antigen determina, de manera simplificada, si una persona és RhD positiva o RhD negativa.

Durant l'embaràs, la incompatibilitat RhD entre la mare i el fetus pot tenir conseqüències clíniques quan una gestant RhD negativa entra en contacte amb hematies fetals que expressen l'antigen D. Aquest contacte pot produir una al·loimmunització materna, amb formació d'anticossos anti-D que poden travessar la placenta i reaccionar contra els eritròcits fetals.

La possibilitat de determinar el RhD fetal durant l'embaràs a partir d'una mostra de sang materna ha representat un important avenç en aquest àmbit. Aquesta determinació és possible gràcies a la presència de DNA fetal lliure circulant (cell-free fetal DNA, cffDNA) en el plasma matern, que permet estudiar determinades característiques genètiques del fetus sense necessitat d'obtenir una mostra fetal mitjançant una tècnica invasiva.

Base genètica del sistema RhD

Els principals gens responsables dels antígens del sistema Rh es troben al braç curt del cromosoma 1 i són els gens *RHD* i *RHCE*. Tots dos gens es troben molt propers i presenten una elevada homologia de seqüència, ja que provenen de la duplicació d'un gen ancestral comú.

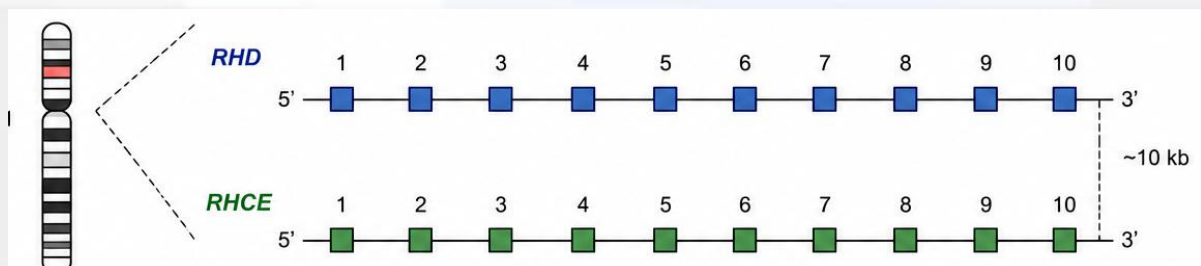
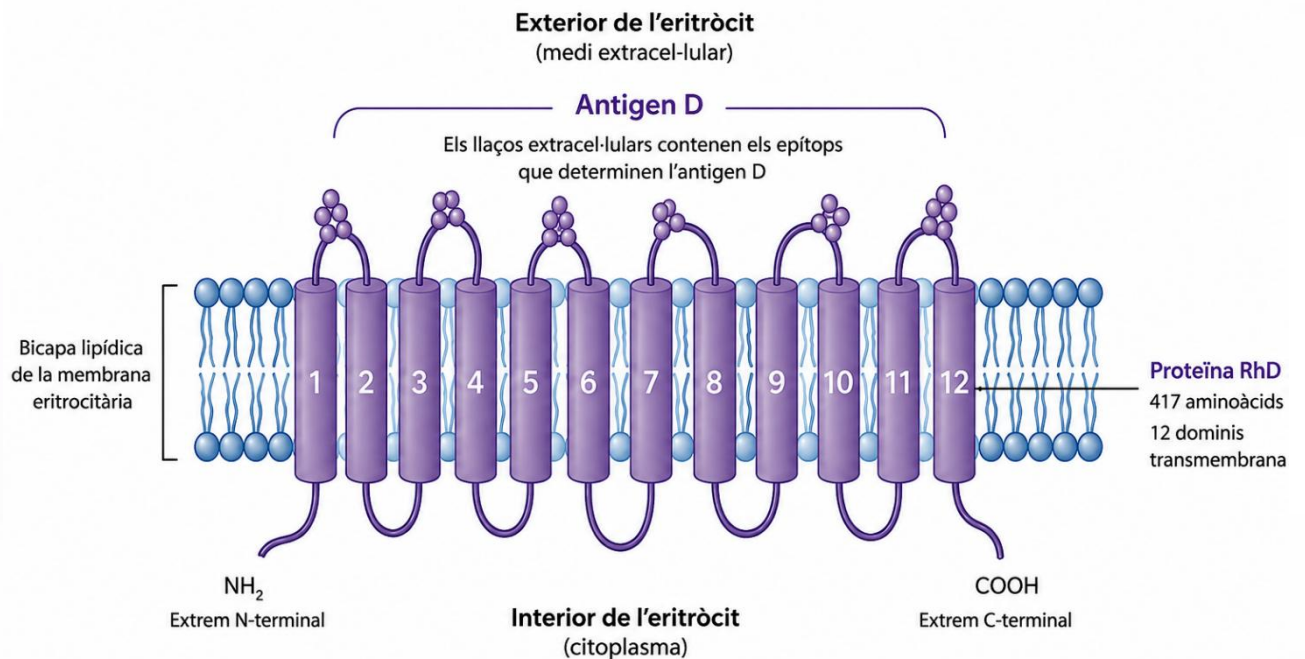


Figura 1. Localització dels gens *RHD* i *RHCE* al braç curt del cromosoma 1 (1p36.11) i organització en 10 exons.
Font: elaboració pròpia a partir de NCBI. The Rh blood group. Blood Groups and Red Cell Antigens. NCBI Bookshelf.

Catlab Informa

El gen *RHD* codifica la proteïna RhD, una proteïna transmembrana de 417 aminoàcids que travessa la membrana de l'eritròcit en 12 segments transmembrana. RhD forma part del complex Rh de la membrana eritrocitària i és la proteïna que porta l'antigen D, un dels antígens més immunògens dels grups sanguinis. La seva estructura presenta diversos segments transmembrana i llaços extracel·lulars, que contribueixen a configurar les regions de la proteïna exposades a la superfície cel·lular i que participen en la determinació dels diferents epítops de l'antigen D.



RhD forma part del complex Rh de la membrana eritrocitària i s'associa amb altres proteïnes del complex (p. ex. RhCE, RhAG) per a una correcta estabilitat i funció de la membrana.

Figura 2. Proteïna RhD a la membrana eritrocitària.

Font: elaboració pròpia a partir d'Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. *Blood*. 2000;95(2):375–387.

L'estreta homologia entre *RhD* i *RhCE* és especialment rellevant des del punt de vista molecular, ja que els processos de recombinació i conversió gènica entre *RHD* i *RHCE* poden originar gens híbrids i variants de l'antigen D, com els fenotips weak D i partial D.

Catlab Informa

RhD positiu i RhD negatiu

En la població europea, la causa molecular més freqüent del fenotip RhD negatiu és la *deleció completa del gen RHD*. Aquesta deleció està relacionada amb processos de recombinació homòloga entre unes regions altament similars que flanquegen el gen, conegudes com a Rhesus boxes.

Tanmateix, no tots els fenotips RhD negatius són conseqüència de la deleció completa de *RHD*. Existeixen nombroses variants del gen que poden alterar l'expressió de l'antigen D, incloent-hi variants *weak D*, *partial D*, variants *DEL* i gens híbrids *RHD-RHCE*. Aquesta diversitat genètica és un dels principals reptes del genotipatge molecular del RhD.

El DNA fetal lliure circulant

Durant l'embaràs, una petita proporció del DNA lliure que circula pel plasma matern procedeix del fetus. Aquest DNA fetal lliure circulant prové principalment de la placenta i es troba barrejat amb una quantitat molt superior de DNA lliure d'origen matern.

Això permet aprofitar una característica genètica fonamental: si la mare és RhD negativa i no presenta el gen *RHD* funcional, la detecció de seqüències específiques de *RHD* en el plasma matern pot indicar la presència de DNA fetal procedent d'un fetus portador de *RHD*.

D'aquesta manera, mitjançant una mostra de sang materna, és possible analitzar indirectament el gen *RHD* fetal durant l'embaràs. Aquesta aproximació constitueix una de les aplicacions clíniques més consolidades del diagnòstic prenatal no invasiu basat en DNA lliure circulant.

Genotipatge fetal del RhD a Catlab

De la sang materna al DNA fetal

La determinació del genotip RhD fetal es realitza a les gestants negatives, a partir d'una mostra de sang materna recollida en un tub d'EDTA de 10 mL. A partir d'aquesta mostra s'obté el plasma, que conté DNA fetal lliure circulant (cffDNA), que és el material genètic que s'analitzarà.

A Catlab, el plasma se separa mitjançant centrifugació i es conserva aproximadament a -80°C fins al moment de l'extracció. Posteriorment, el DNA s'extreu de manera semi-automatitzada amb el sistema QIAcube, utilitzant el kit QIAamp MinElute ccfDNA Mini Kit.

Catlab Informa

Detecció molecular del genotip RhD fetal

El cfDNA extret s'analitza amb el kit FastQ® RhD fetal. La metodologia es basa en una PCR específica d'al·lel (PCR-SSP) amb detecció de l'amplificació mitjançant PCR en temps real.

La reacció permet analitzar tres regions específiques del gen RHD: els exons 5, 7 i 10. Cada mostra es processa per triplicat, de manera que s'obtenen fins a nou deteccions específiques per mostra.

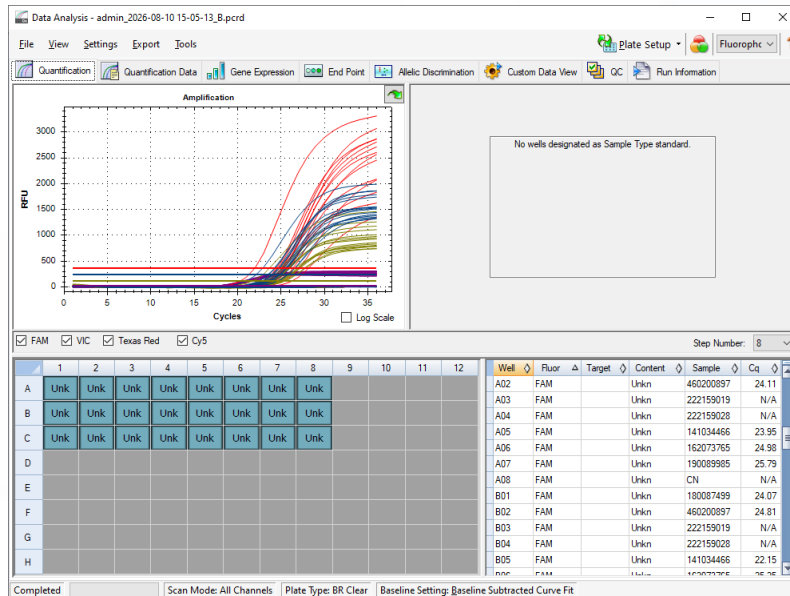


Figura 3. Exemple de corbes d'amplificació obtingudes amb el sistema CFX96 durant el genotipatge RhD fetal.

Cada diana molecular es detecta mitjançant un fluoròfor específic: l'exó 5 es detecta en el canal FAM, l'exó 7 en VIC i l'exó 10 en Texas Red. La reacció incorpora, a més, un control intern d'amplificació (IAC), associat al gen humà HCG, que es detecta en el canal Cy5.

Per a la interpretació dels resultats, les amplificacions específiques es consideren positives quan presenten un valor de $Cq \leq 30$. El control intern permet comprovar que la reacció conté DNA humà amplificable.

Especificitat	Fluoròfor	Criteri
Control intern d'amplificació (IAC)	Cy5	$Cq \leq 30$
Exó 5	FAM	$Cq \leq 30$
Exó 7	VIC	$Cq \leq 30$
Exó 10	Texas Red	$Cq \leq 30$

Catlab Informa

Cada sèrie analítica incorpora un control negatiu (NTC) amb aigua destil·lada, que permet controlar possibles contaminacions. En condicions adequades, el control negatiu no ha de mostrar senyal de fluorescència dins dels valors de Cq establerts.

La interpretació també té en compte els possibles artefactes de PCR, especialment en el canal Cy5 dels controls negatius, que poden aparèixer com a senyals tardans i requereixen una valoració conjunta amb la resta de resultats del run.

Interpretació del genotip RhD fetal

La determinació es basa en el nombre de deteccions específiques positives obtingudes entre les nou possibles combinacions (tres exons analitzats per triplicat).

La interpretació no es basa únicament en el nombre total de senyals positius. La distribució dels senyals entre els exons 5, 7 i 10 aporta informació addicional. Els patrons de detecció discordants entre aquests exons poden estar relacionats amb variants del gen *RHD*, com gens híbrids *RHD-RHCE*, variants weak D o partial D, i poden donar lloc a resultats no valorables.

Patró de detecció	Interpretació	Actuació / resultat
≥ 4 de les 9 deteccions específiques positives	Genotip RHD fetal positiu	Resultat positiu.
1–2 de les 9 deteccions específiques positives	Genotip RHD fetal negatiu	Si la gestació és ≤20 setmanes, s'ha de repetir l'estudi a partir de la setmana 20.
3 deteccions positives o patró discordant entre els exons 5, 7 i 10	Resultat no valorable	Repetir l'estudi i realitzar una valoració específica del patró.
Cap exó específic detectat	Genotip RHD fetal negatiu	Resultat negatiu, sempre que els controls siguin vàlids.
Control intern (Cy5) absent / reacció inhibida	Resultat invàlid	Reacció no interpretable; cal repetir l'estudi.

Tots els resultats no valorables es repeteixen. Si, després de la repetició, el resultat continua sent no valorable, el maneig de la gestació és el d'un possible fetus RhD+, per prudència obstètrica.

El genotipatge fetal del RhD en gestants RhD negatives, a partir de DNA fetal lliure circulant, permet determinar si el fetus és RhD positiu o negatiu mitjançant una simple mostra de sang materna, sense necessitat de procediments invasius. Aquesta determinació aporta informació rellevant per a la gestió de l'embaràs i permet adaptar la profilaxi anti-D a les necessitats de cada gestant, contribuint a una atenció més precisa, segura i personalitzada..

Catlab Informa

Jordi Roigé

Facultat de la secció de Genètica

CATLAB

jroige@catlab.cat

www.catlab.cat

Bibliografia

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.
-