



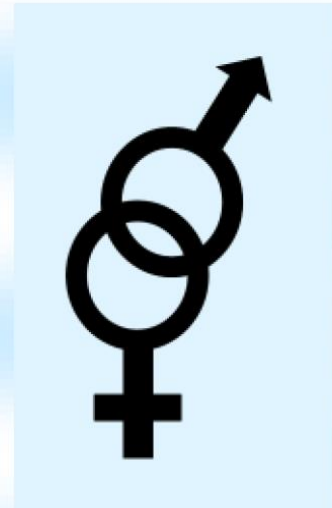
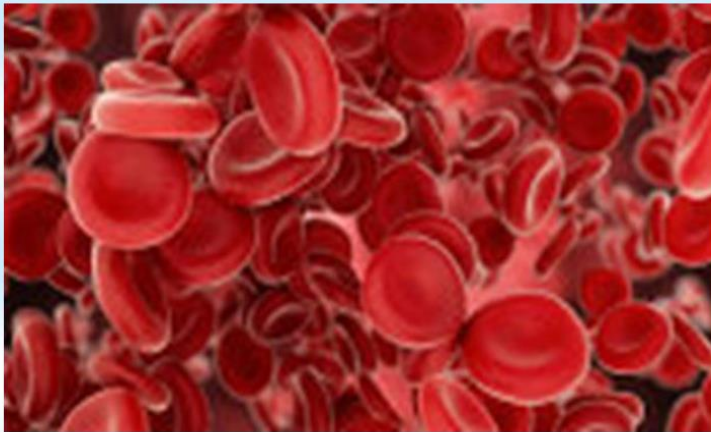
Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

**APLICACIÓ A LA PRÀCTICA
CLÍNICA DE LA DETERMINACIÓ
PRENATAL NO INVASIVA DEL
GENOTIP RHD FETAL DURANT EL
PRIMER TRIMESTRE DE LA
GESTACIÓ EN GESTANTS RhD
NEGATIVES**



Obdulia Alejos Abad

**APLICACIÓ A LA PRÀCTICA
CLÍNICA DE LA DETERMINACIÓ
PRENATAL NO INVASIVA DEL
GENOTIP RHD FETAL DURANT EL
PRIMER TRIMESTRE DE LA
GESTACIÓ EN GESTANTS RhD
NEGATIVES**

TESI DOCTORAL

Obdulia Alejos Abad

2022



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE PEDIATRIA, OBSTETRÍCIA I
GINECOLOGIA

Aplicació a la pràctica clínica de la determinació prenatal no invasiva del genotip RHD fetal durant el primer trimestre de la gestació en gestants RhD negatives

TESI DOCTORAL

Obdulia Alejos Abad

DIRECTORS

Dra. Núria Nogués Gálvez

Dr. Juan Parra Roca

TUTORA

Dra. Elisa Llurba Olivé

Barcelona, 2022

ÍNDEX

1. RESUM
2. INTRODUCCIÓ
 - 2.1. MALALTIA HEMOLÍTICA DEL FETUS I EL NOUNAT (MHFN)
 - 2.1.1. DEFINICIÓ
 - 2.1.2. HISTÒRIA
 - 2.1.3. INCIDÈNCIA
 - 2.1.4. ETIOPATOGENIA
 - 2.2. PROCÉS D'AL·LOIMUNITZACIÓ MATERNA
 - 2.2.1. FACTORS QUE INCIDEIXEN EN L'AL·LOIMUNITZACIÓ MATERNA
 - 2.2.1.1. L'especificitat de l'anticòs
 - 2.2.1.2. Existència de fenòmens que poden causar la immunització
 - 2.2.1.3. Resposta immune materna
 - 2.2.2. TRANSFERÈNCIA PLACENTÀRIA DELS ANTICOSSOS MATERNS.
 - 2.2.3. DESTRUCCIÓ DE LES HEMATIES FETALS.
 - 2.3. ESTUDI IMMUNOHEMATOLÒGIC I DIAGNÒSTIC DE LA ISOIMUNITZACIÓ DE LA GESTANT
 - 2.4. MANEIG DE L'AL·LOIMUNITZACIÓ MATERNA. PROTOCOL DE L'HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU.
 - 2.4.1. GESTANT Rh(D)-NEGATIU O POSITIU NO SENSIBILITZADA
 - 2.4.1.1. Gestants Rh (D) negatiu no sensibilitzada
 - 2.4.1.2. Gestants Rh (D) positiu no sensibilitzada
 - 2.4.2. GESTANT Rh(D)-NEGATIU O POSITIU SENSIBILITZADA

2.4.2.1. Gestants Rh(D) negatiu amb anticossos d'especificitat anti-RhD

2.4.2.1.1. Seguiment de la gestant Rh (D) negatiu de baix risc.

2.4.2.1.2. Seguiment de la gestant Rh (D) negatiu d'alt risc

2.4.2.2. Gestants al·loimmunitzades amb anticossos d'especificitat no anti-RhD.

2.5. PROFILAXI DE LA ISOIMMUNITZACIÓ Rh(D)

2.6. GRUP RHESUS D (RhD)

2.6.1. GENÈTICA DEL SISTEMA RH

2.6.1.1. La base molecular dels al·lels RH

2.6.1.2. La base molecular dels fenotips Rhesus

2.6.1.2.1. Fenotip D negatiu

2.6.1.3. La base molecular de les variants de l'antigen D

2.6.1.3.1. D parcial

2.6.1.3.2. D feble

2.6.1.3.3. DEL

2.6.1.4. Els antígens C/c i E/e

2.7. DETERMINACIÓ NO INVASIVA DEL GENOTIP RHD FETAL

2.7.1. PRESENCIA DE cfDNA EN SANG MATERNA

2.7.2. MÈTODE DE DETERMINACIÓ NO INVASIVA DEL GENOTIP RHD FETAL A SANG MATERNA

3. JUSTIFICACIÓ DE L'ESTUDI

4. HIPÒTESI

5. MATERIAL I MÈTODES

5.1. DISSENY DE L'ESTUDI

5.1.1. Pacients

5.2. PROTOCOL D'ESTUDI

5.2.1. Variables registrades

5.2.2. Mostres

5.2.3. Mètode de determinació del genotip RHD fetal a partir del plasma matern

5.3. ANÀLISI ESTADÍSTIC

6. OBJECTIUS

6.1. OBJECTIU PRINCIPAL

6.2. OBJECTIUS SECUNDARIS

7. RESULTATS

7.1. MOSTRES RECLUTADES

7.2. RESULTATS GENOTIPATGE RHD FETAL

7.3. GRAU DE CONCORDANÇA ENTRE EL GENOTIP RHD FETAL I EL FENOTIP RhD DEL NOUNAT

7.4. RESULTAT DE L'ANÀLISI ESTADÍSTIC

7.5. ADMINISTRACIÓ DIRIGIDA DE LA GAMMAGLOBULINA ANTI-D

7.6. ANÀLISI COST-BENEFICI DE LA IMMUNOPROFILAXI DIRIGIDA PER LA DETERMINACIÓ PRENATAL DEL GENOTIP RHD FETAL VERSUS EL MODEL ACTUAL

8. DISCUSSIÓ

8.1. PRINCIPALS TROBALLES D'INTERÈS

8.2. RELACIÓ DELS NOSTRES RESULTATS AMB ELS OBTINGUTS A ESTUDIS PREVIS

8.3. ANÀLISI COST-BENEFICI DE L'IMPLEMENTACIÓ DEL PROGRAMA DE GENOTIPATGE RHD FETAL

8.4. LIMITACIONS DE L'ESTUDI

9. CONCLUSIONS

10. BIBLIOGRAFIA

11. ANNEXOS

11.1. ANNEX 1. ESTUDI IMMUNOHEMATOLÒGIC DE LES GESTANTS. PROTOCOL PER AL DIAGNÒSTIC I LA PREVENCIÓ DE LA MALALTIA HEMOLÍTICA DEL FETUS I DEL RECENT NASCUT (MHFN). HSP. 2019.

11.2. ANNEX 2. PROTOCOL DE MANEIG DE LA GESTANT ISOIMUNITZADA. PROTOCOL PER AL DIAGNÒSTIC I LA PREVENCIÓ DE LA MALALTIA HEMOLÍTICA DEL FETUS I DEL RECENT NASCUT (MHFN). HSP. 2019.

11.3. ANNEX 3. GUIA CLÍNICA DE DETERMINACIÓ DEL GENOTIP RHD FETAL EN PLASMA MATERN.

11.4. ANNEX 4. DETERMINACIÓ DEL GENOTIP RHD FETAL A PARTIR DE PLASMA MATERN MITJANÇANT PCR A TEMPS REAL.

11.5. ANNEX 5. DICTAMEN FAVORABLE DEL COMITÈ ÈTIC D'INVESTIGACIÓ CLÍNICA.

11.6. ANNEX 6. CONFORMITAT DE LA DIRECCIÓ DEL CENTRE.

12. PRODUCCIÓ CIENTÍFICA

12.1. PRESENTACIÓ A CONGRESSOS

ABREVIATURES I ANGLICISMES

Ac	Anticòs
BST	Banc de Sang i Teixits
cfDNA	cell free DNA
	ADN circulant en forma lliure de cèl.lules
cffDNA	cell free fetal DNA
	ADN d'origen fetal circulant en forma lliure de cèl.lules
CEIC	Comité Ètic d'Investigació Clínica
CLT	Chemilluminescence. Quimioluminiscència.
DS	Desviacions standard
EAI	Escrutini d'anticossos eritrocitaris irregulars
EBF	Eritroblastosis fetal
EDTA	Àcid etilendiaminotetraacètic
ELAT	Enzyme-Linked Antiglobulin Test. <i>Tècnica d'antiglobulina enzimàtica</i>
FcR	Receptor específic del fragment Fc de les immunoglobulines
HSPSC	Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona
HTP	Hemorràgia transplacentària
IC	<i>Interval de confiança</i>
Ig	Immunoglobulina
ILA	Índex de líquid amniòtic
HTP	Hemorràgia transplacentària
K-ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity assays with K lymphocytes Assaigs de citotoxicitat cel·lular dependent d'anticossos amb limfòcits K
M-ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity assays with monocytes Assaigs de citotoxicitat cel·lular dependent d'anticossos amb monòcits
MHFN	Malaltia hemolítica del fetus i el nounat
MIU	Mort intrauterina
MMA	Monocyte monolayer assay Assaig de monocapa de monòcits
MoM	múltiples de la mitjana
MPN	Mort en el període postnatal
NIPD	Non-invasive prenatal diagnosis Diagnòstic prenatal no invasiu
NIPT	<i>Non invasive prenatal test</i> <i>Test prenatal no invasiu</i>
NK	Natural Killers.
PA	Perímetre abdominal
PCR	Polymerase chain reaction Reacció en cadena de la polimerasa
PNT	Procediment normalitzat de treball

PSV-ACM	Pic sistòlic de velocitat de l'artèria cerebral mitja
RhAG	Glicoproteïna associada al Rh
sg	Setmanes de gestació
SNP	Single Nucleotide Polymorphism SNP Polimorfisme d'un sol nucleòtid
TIU	Transfusió intrauterina

AGRAÏMENTS

En primer lloc, vull agrair tot el que sóc als meus pares. Han estat el millor regal que algú va posar en la meva vida. Sempre comprensius, amorosos, atents, abnegats, ... amb una paciència que no ha tingut límits i ajudant-me i oferint-me el millor en cada moment de la meva vida. Heu resultat inesgotables... Francament, un puntal a la meva vida i un referent del que es considera uns bons pares. MOLTES GRÀCIES DE TOT COR! SOUS ELS MILLORS! (malgrat que gairebé mai m'ho sentiu dir...).

Agrair també la comprensió i l'amor per part de ma germana (la "tata" com sempre li dic...). La personificació de la paciència amb mi. Desde ben petita volia una "germaneta" però no imaginava la que se li venia a sobre... Tremenda com sóc i ella sempre pacient amb mi i consentidora. Encara recordo com durant el MIR la tenia tan farta que em deia que faria la residència a "Guarromán", ...

Ets la millor "tata" que vaig poder desitjar!!! I ara millor, ... ets la "tata" de la meva filla.

Vull fer una especial menció al Professor Calaf. Tenir-lo com a "jefe" va ser un plaer. Sempre li agrairé que em donés una oportunitat. El portaré sempre al meu cor com a un gran professional però encara més per ser una gran persona amb un cor immens.

Al Dr. Parra, per mi el "Juan", si aquesta tesi està acabada és gràcies a que un dia tú em vas animar a començar-la i en aquest llarg i tòpid camí m'has insistit i donat forces per a que l'acabés, el meu embarç, el COVID, l'assistència, ... no m'ho han posat gens fàcil però sempre has estat allà per a encoratja-me i animar-me a acabar-la. Moltes gràcies per això i per mil coses més... Vas confiar en mi i em vas donar un lloc al teu àmbit laboral. Has aconseguit que m'enamori de la Medicina Fetal... Ets el millor jefe i company que podia haver desitjat fa 12 anys....

A la Dra. Núria Nogués, moltes gràcies per la teva gran ajuda. Sense tu aquest treball hagués estat impossible... Sempre tant atenta i ajudant-me en tot. Recordo molt gratament les meves visites al Banc de Sang i tots els nostres mails.... Moltíssimes gràcies per la teva paciència i dedicació aquests anys. Sempre et recordaré i espero poder iniciar nous projectes amb tu.

A la Dra. Llurba, has fet possible que hagi pogut finalitzar aquest projecte. Gràcies per la teva col. laboració i celeritat en participar. T'ho agrairé sempre.

No voldria deixar de mencionar la meva nena. TÚ has estat un dels motius del meu endarreriment en aquest treball i també el motor per a finalitzar aquest projecte. Ets un tot en la meva vida. Mai vaig pensar que es pogués arribar a estimar TANT, Ja saps que TÚ ets l'únic realment BO que he fet en aquests 42 anys, Pararia la meva vida les vegades que calgués per tu...

Alberto, gràcies per intentar entendre el meu treball. No sempre ha estat fàcil però ho has fet amb nota alta.

Si faig una ullada enrere no voldria deixar de mencionar a mi “rachel” (la Dra. Senosiain) que tant em va recolzar als meus inicis. Va ser genial treballar amb tu, una de les millors experiències professionals. Et trobo a faltar cada dia que vinc al “nostre” hospital....

Finalment, vull tenir un especial record per a tots els professionals (metges, llevadores, auxiliars, infermeres, administratius, cel. ladors, ...) que han passat per la meua vida. Són molts però han fet de mi el que actualment sóc com a professional. Mencionar a alguns d’ells seria oblidar-me d’altres i donat que no em sembla just tots els afectats segur que en són conscients... Moltes gràcies a tots per acompanyar-me i ajudar-me aquests anys!

1. RESUM

L'alloimmunització contra l'antigen RhD eritrocitari és la causa més freqüent de malaltia hemolítica feto neonatal (MHFN). Per aquest motiu, té una gran importància durant la gestació ja que la incompatibilitat RhD afecta aproximadament a un 12% de les parelles del nostre medi.

Actualment, totes les gestants RhD negatiu estan sotmeses a un programa d'immunoprofilaxis universal basat en l'administració de la gammaglobulina anti-D amb l'objectiu de prevenir la MHFN. Així doncs, reben una dosi de gammaglobulina al voltant de les 28sg de la gestació, davant la presència d'events immunitzants i en el postpart (en aquest darrer cas únicament si el nounat presenta un fenotip RhD positiu).

No obstant, és molt important recordar que fins al 40% de les gestants RhD negatiu són portadores de fetus RhD negatiu que fan innecessària la immunoprofilaxis, evitant així no només el cost de la seva administració, sino també l'exposició als potencials riscos biològics del producte (presència de virus o prions que amb les actuals tècniques de laboratori no és possible detectar) ja que és un derivat humanoide.

Al 1997, Lo i els seus col.laboradors ²⁶⁻²⁷ van demostrar que al voltant del 3-6% de l'ADN que circula lliure al plasma de les gestants és d'origen fetal. La seva concentració augmenta a mesura que avança la gestació i desapareix a les 2 hores postpart ²⁸.

Després d'aquest descobriment es va obrir un ampli camp d'investigació conegut amb el nom de diagnòstic prenatal no invasiu (NIPD) i, de fet, la determinació del genotip RHD fetal a plasma matern de les gestants RhD negatiu va ser una de les seves primeres aplicacions a la pràctica clínica ¹⁷⁴.

La possibilitat de conèixer el genotip RHD fetal a partir d'una mostra de plasma matern és probablement l'avenç més important a la història d'aquesta malaltia (MHFN), després de la introducció de la profilaxi amb la gammaglobulina anti-D.

Malgrat que fins a l'actualitat es disposava d'una àmplia experiència en la determinació del genotip RHD fetal no invasiu en el cas de les gestants al.loimmunitzades, no ha estat fàcil intentar establir un programa de cribatge RHD fetal per a indicar l'administració selectiva i dirigida de la gammaglobulina anti-D.

Les dades de les que disposem sobre programes ja implementats a altres països d'Europa (Dinamarca (2010), Països Baixos (2011), Finlàndia (2014),...) ¹⁹⁷ de cribatge RHD fetal, així com les d'estudis realitzats a gran escala, demostren l'alta sensibilitat i viabilitat del cribatge prenatal RHD.

No obstant, és important recordar que la majoria dels estudis publicats fins ara s'han realitzat a partir de mostres sanguínies obtingudes a edats

gestacionals avançades (segon i tercer trimestre) donat que la quantitat de cffDNA augmenta a mesura que augmenta l'edat gestacional. Nosaltres, en canvi, hem realitzat el nostre estudi a partir de mostres de plasma obtingudes durant el primer trimestre.

Al Gener del 2013 es va posar en marxa una guia de pràctica clínica per part del Servei de Ginecologia i Obstetrícia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau en col.laboració amb el Banc de Sang i Teixits de Barcelona amb l'objectiu d'evaluar la sensibilitat i la especificitat del mètode de determinació del genotipat RHD fetal realitzat en plasma pertanyent a gestants RhD negatiu durant el primer trimestre de la gestació i evaluar així la possibilitat de la seva implementació universal a la pràctica clínica habitual.

En el nostre cas, el genotip RHD fetal es va determinar fent servir la tècnica de PCR a temps real en un anàlisi TaqMan que analitzava dos seqüències del gen RHD, una seqüència a l'exó 5 i una altra a l'exó 10. Com a marcador addicional per a detectar la presència de cffDNA es va fer servir el gen SRY com a marcador del cromosoma Y ²¹⁰.

El percentatge de resultats no concloents va ser baix (0.94%) i després de repetir una única vegada la determinació en tots els casos es va poder determinar el genotip. La sensibilitat obtinguda va ser del 99.66% (IC 95% (98.82-100) amb una taxa de falsos negatius del 0.34% (inferior al reportat per altres estudis) i la de falsos positius del 1.19%. La especificitat va ser 98.81% (IC 95% (96.87-100)).

Així doncs, tenint en compte els resultats obtinguts, l'aplicació de la nostra guia de pràctica clínica de forma universal malgrat que podria provocar l'administració innecesària de gammaglobulina anti-D al 1.19% (taxa de falsos positius a la nostra sèrie) de les mares portadores de fetus RhD negatiu evitaria l'administració innecessària al 36.09% de mares RhD negatiu no isoimmunitzades, evitant així els riscos de l'exposició a material biològic aliè.

La nostra aproximació al cost/benefici d'aquesta tècnica indica que és possible la seva implementació a la pràctica clínica habitual sense que això incrementi de manera significativa el cost del programa preventiu. Si es realitzés una implementació universal del genotipat RHD prenatal durant el primer trimestre el cost addicional de la tècnica pràcticament quedaria justificat per una raó de pes i és que permetria una immunoprofilaxi selectiva de la gammaglobulina anti-D ²⁰⁸⁻²⁰⁹.

A més a més, en gestants isoimmunitzades disposar de la determinació del genotip RHD fetal al primer trimestre de forma rutinària permetria també reduir les despeses associades a les visites a Unitats d'Alt risc i Medicina Fetal i a determinacions serològiques seriades si determinem que la gestant és portadora d'un fetus RhD negatiu. Per no mencionar, la disminució de l'angoixa dels pares quan determinem un genotip RHD fetal negatiu.

En resum, els resultats obtinguts demostren que els fetus de les gestants RhD negatiu poden ser genotipats a l'inici de la gestació amb una elevada fiabilitat, el que ens aboca a afirmar que probablement estem en condicions d'acceptar la determinació del genotip RHD fetal prenatal no invasiu com a un test segur i fiable per a dur a terme la seva implementació a la pràctica clínica habitual i oferir-lo a les gestants durant el primer trimestre de la gestació de forma universal.

2. INTRODUCCIÓ

2.1. MALALTIA HEMOLÍTICA DEL FETUS I EL NOUNAT (MHFN)

2.1.1. DEFINICIÓ

La MHFN o eritroblastosis fetal (EBF) s'origina com a conseqüència de la destrucció dels glòbuls vermells fetals induïda per l'acció d'autoanticossos IgG de la mare que travessen la placenta i que reaccionen de forma específica amb un antígen d'origen patern, present en les hematies fetals i absent als eritròcits materns ^{1,2,3}.

La MHFN comença a la vida intrauterina afectant al fetus i, més tard, al nounat ^{2,3}. La gravetat de la malaltia pot oscil·lar des d'alteracions hematològiques detectables únicament mitjançant proves de laboratori fins a dany cerebral greu ("kernicterus") provocat pels alts nivells de bilirubina circulant o inclús la mort fetal intraúter ⁴⁻⁸.

2.1.2. HISTÒRIA

El primer esment de què disposem d'aquesta malaltia es troba a les memòries d'una llevadora que es deia Louise Bourgeois ⁴ que va descriure en 1609 el part d'uns bessons. Explicava que el primer va néixer clarament hidròpic i va morir al part i l'altre va presentar un quadre d'icterícia a les 3 primeres hores de vida i va morir als 3 dies.

Diamond i cols ⁹ al 1898 van publicar un article on es recollien setanta casos de nounats que presentaven edema generalitzat amb icterícia neonatal greu i anèmia però sense determinar l'etiologia d'aquest quadre.

No va ser fins l'any 1938 que una patòloga americana anomenada Ruth Darow ² va emetre una hipòtesi que feia referència al fet que les troballes anatomopatològiques dels fetus i nounats morts per MHFN podien ser deguts a una reacció antígen-anticòs.

L'any 1940, Landsteiner i Wiener ¹⁰ realitzant assajos en conills i cobais als que inoculaven hematíes de mico "Macacus Rhesus" van detectar que aquests animals desenvolupaven un anticòs que aglutinava no només les hematies del Macacus sino també aproximadament el 85% de la sang dels individus de raça blanca a l'estat de Nova York. Als individus amb hematíes que aglutinaven amb aquest anticòs els van anomenar Rh (de Rhesus) positiu i Rh negatiu al 15% restant de la població.

Més endavant, l'any 1945 Coombs, Mourant i Race ¹¹ van descriure el test de l'antiglobulina que permetia detectar els anticossos circulants en sang materna responsables de la destrucció dels hematíes fetals.

L'any 1947, Diamond ⁹ va presentar una comunicació a la *Royal Society of Medicine* in London on explicava els beneficis de realitzar una inducció precoç en els casos de MHFN greus i va descriure un rudimentari sistema que feia servir un catèter de plàstic per a canular la vena umbilical. Aquesta va ser la primera descripció de l'exanguinotransfusió que ha anat perfeccionant-se amb el pas dels anys.

Després de tots aquests descobriments va haver un gran avenç en el diagnòstic i tractament de la MHFN: l'estudi de l'herència dels grups sanguinis, el desenvolupament del test de l'antiglobulina, l'extensió de l'ús de l'exanguinotransfusió i, posteriorment, el desenvolupament de la transfusió intrauterina ¹¹⁻¹⁶.

Així doncs, abans de l'any 1945 al voltant del 50% de fetus amb MHFN morien a conseqüència del kernicterus i/o de l'hidrops fetal i després de la introducció de l'exanguinotransfusió la mortalitat als països desenvolupats va caure fins al 2-3% ^{14,16}.

No obstant, el pas més important en la lluita contra la MHFN va ser la incorporació, a la dècada dels anys 70, de l'ús profilàctic de la gammaglobulina anti-D, primer en el postpart i després també una dosi antenatal, que va reduir el risc d'isoimmunització anti-D del 13% al 0.2-0.4%¹⁷⁻²⁴. De la mateixa forma, la mortalitat perinatal també va presentar un descens del 1.3/1000 naixements a l'any 1960 a 0.2/1000 naixements al 1980 ¹⁷⁻¹⁹.

Va ser més recentment, l'any 1997, quan Lo i els seus col.laboradors ^{25,26} van demostrar que al voltant del 3-6% de l'ADN que circula en forma lliure en el plasma de les gestants és d'origen fetal. La seva concentració augmenta a mesura que avança la gestació i desapareix a les 2 hores postpart ²⁷. Aquest descobriment va obrir un ampli camp d'investigació que ha permès el desenvolupament de tot un ventall d'aplicacions diagnòstiques en l'àmbit del que avui dia coneixem com a diagnòstic prenatal no invasiu (NIPD) ²⁸⁻³⁶. La determinació del genotip *RHD* fetal en plasma matern en gestants RhD negatives va ser, de fet, una de les primeres aplicacions incorporades a la pràctica clínica ³⁷.

Posteriorment, estudis a gran escala han demostrat que es tracta d'una determinació sensible i fiable ³⁸⁻⁴⁴ i, per aquest motiu, diversos països europeus (Dinamarca, Holanda, Finlàndia o Anglaterra) ho han introduït als seus programes nacionals o

regionals (França i Bèlgica) com a prova de cribatge per a les gestants RhD negatives no immunitzades.

Actualment, al nostre país el genotipatge *RHD* fetal no s'ha introduït com una prova de cribatge universal a totes les gestants RhD negatives. No obstant això, el seu ús és una eina primordial en el maneig de la gestant amb isoimmunització anti-D i també en l'administració de la profilaxi dirigida a gestants RhD negatiu motiu pel qual cada vegada s'estan fent més esforços per a incloure el genotipatge *RHD* fetal com una prova rutinària.

2.1.3. INCIDÈNCIA

Cinquanta anys enrere morien a Anglaterra i Gal.les uns 1000 nounats/any afectes d'aquesta malaltia, el que suposava una incidència de 150 morts per cada 100.000 naixements ⁴⁵. Al començament dels anys quaranta, a Maitoba (Canadà), un 10% de les morts perinatal es produïen per MHFN i la incidència d'exitus entre els nounats afectats per la malaltia era d'un 40%. Les millores introduïdes en les cures obstètriques i neonatals van permetre reduir en 10 vegades la incidència d'exitus, fonamentalment amb la introducció de l'exsanguinotransfusió, el part preterme, i finalment, la transfusió intrauterina ⁴⁶⁻⁵⁹.

Als països occidentals, entre els anys 1968 i 1994, la prevalença de la MHFN va disminuir de 4-5/1000 fins a 0.5/1000 nascuts vius, gràcies a la introducció de l'administració de la gammaglobulina anti-D antenatal ¹⁸⁻²⁰ i postpart, com a mesura preventiva de la isoimmunització anti-D en gestants RhD negatives ⁶⁰⁻⁶³. Per exemple, a París hi va haver 85.000 nascuts vius l'any 1994 i 75 casos de MHFN, el que ens dona una incidència de 0.9/1000 nascuts vius.

Als inicis del segle XXI, al Regne Unit la incidència d'alloimmunització materna es va situar al voltant del 1-1.5% degut, principalment, a errors en l'administració de la gammaglobulina anti-D, a hemorràgia transplacentària antepartum o a hemorràgia important durant el treball de part ¹⁹.

No obstant, la prevalença de la MHFN al Regne Unit és de 1 de cada 21.000 naixements. A Anglaterra i Gal.les, al voltant de 500 fetus desenvolupen MHFN cada any, dels quals 25-30 nens moren i al menys 20 gestacions a l'any es perden per avortament espontani abans de les 24 setmanes de gestació per aquest motiu ¹⁹⁻²⁰.

La incidència d'alloimmunització registrada a Irlanda del Nord ⁶⁴ en el període comprès entre Gener del 2010 i Setembre del 2015 va ser del 3,1 gestants per mil.

Per últim, mencionar que a Islàndia⁶⁵ la incidència d'isoimmunització entre els anys 1996 i 2015 es va estimar en 6.1 per cada 1000 naixements en gestants RhD negatives. No obstant, s'ha de tenir en compte que aquesta incidència es va estimar abans d'introduir el programa d'immunoprofilaxis avantpart amb gammaglobulina anti-D.

2.1.4. ETIOPATOGÈNIA

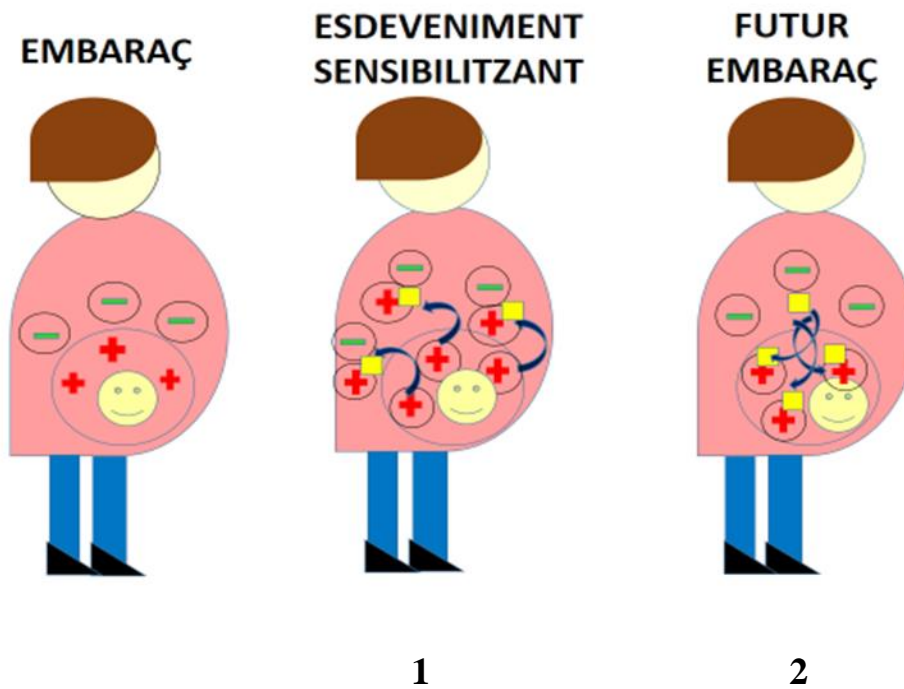
La MHFN va ser reconeguda com a una síndrome clínica a començaments del segle XX^{9,66,67} (dècada 1920-1930) malgrat que el primer registre documentat correspon a inicis del segle XVII²². El seu quadre clínic inclou una anèmia d'origen hemolític, eritroblastosi, hidrops fetal (acúmul excessiu de líquids a l'espai extravascular) i icterícia de diversos graus de gravetat^{3,4,67,68}.

La etiopatogènia d'aquesta malaltia està lligada a la presència d'anticossos materns de tipus IgG que travessen la barrera placentària i passen a la circulació fetal. Aquests anticossos s'uneixen a l'antigen de membrana dels glòbuls vermells fetals contra el que van dirigits, produint la seva destrucció, principalment a la melsa.

En el cas de la MHFN-Rh la majoria dels casos es donen quan una mare RhD negatiu es troba gestant d'un fetus RhD positiu. Com ja hem comentat amb antelació, els anticossos anti-RhD materns, que generalment pertanyen a la classe IgG, i per tant, tenen la facultat d'atravessar la barrera hematoplacentària, arriben a la circulació fetal a on s'uneixen amb els eritròcits fetals i acceleren la seva destrucció, majoritàriament a la melsa⁶⁹⁻⁷². Al produir-se una destrucció accelerada dels glòbuls vermells el fetus pateix una anèmia, amb presència d'eritroblasts a la sang perifèrica, i degut al catabolisme de quantitats elevades d'hemoglobina es produeix un increment en els nivells de la bilirrubina no conjugada, ocasionant icterícia i, en casos greus, neurotoxicitat que pot conduir a la mort intraúter del fetus³.

Tret que la mare s'hagi sensibilitzat prèviament per alguna transfusió, és molt poc freqüent que la MHFN esdevingui durant el primer embarç (0.4 a 2% de tots els casos)⁴⁷. Habitualment, en el transcurs de la primera gestació es produeix la sensibilització materna o resposta primària (**Figura 1**), caracteritzada per la producció d'una escassa quantitat d'anticossos de tipus IgM, immunoglobulines que no travessen la placenta. A les successives gestacions, i després d'una nova exposició a l'antigen, es produïran anticossos de classe IgG com a resultat d'una resposta anamnèsica o secundària, i aquests anticossos,

per la seva naturalesa IgG, travessaran la barrera placentària i acabaran produïnt hemòlisi ^{47,76-86}.



1. Els eritròcits fetals entren en contacte amb la sang materna
2. La mare té anticossos anti-D que poden destruir els glòbuls vermells fetals

Figura 1. Etiopatogènia MHFN.

La resposta immunitària dependrà bàsicament de:

- la immunogenicitat de l'antigen
- el volum i nombre d'esdeveniments immunitzants
- la capacitat de resposta del receptor
- l'administració o no de la profilaxis amb gammaglobulina anti-D.

De tots els fetus afectats per MHFN:

- Aproximadament un 20-25% dels casos manifestaran la seva forma més greu (hídrops fetal i mort) i de tots aquests casos aproximadament el 50% debutaran abans de les 34 setmanes de gestació ⁷⁶.
- En un 25% dels casos els fetus patiran una hemòlisi menys intensa però podran desenvolupar kernicterus si no són tractats correctament al néixer.
- El 50% restant dels casos els fetus naixeran amb una afectació lleugera i es recuperaran sense tractament.

2.2. PROCÉS D'AL.LOIMUNITZACIÓ MATERNA

En aquest apartat comentaré breument els aspectes més rellevants relacionats amb el procés d'alloimmunització materna.

2.2.1. FACTORS QUE INCIDEIXEN EN L'AL.LOIMUNITZACIÓ MATERNA

2.2.1.1. L'especificitat de l'anticòs

L'exposició materna a un antigen que no està present en els seus hematies pot desencadenar una resposta immune i la formació de l'alloanticòs corresponent.

L'estructura de l'antigen, la seva distribució tissular i la seva densitat antigènica en la membrana dels hematies tenen un paper determinant que condiciona la producció o no final de l'hemòlisi ^{86,87}.

No obstant, qualsevol anticòs matern de classe IgG dirigit contra un antigen ben desenvolupat als hematies fetals pot acabar ocasionant una MHFN.

Els anticossos IgG més freqüents són els del sistema ABO (anti-A i anti-B) i, tanmateix, la seva capacitat per produir hemòlisi fetal és, tret d'algunes excepcions, limitada. Si bé els infants afectats poden desenvolupar kernicterus si no són tractats, l'hídrops fetal és molt infreqüent, de manera que no es recomana fer valoracions antenatals de la possible afectació fetal, en els casos d'incompatibilitat ABO maternofetal.

Malgrat que l'administració profilàctica de la gammaglobulina anti-D ha reduït dràsticament la incidència d'alloimmunització a l'antigen Rh(D), els anticossos més comuns en la MHFN greu continuen essent els d'especificitat anti-Rh(D). Tot i que, potencialment, qualsevol anticòs pot produir aquesta complicació ^{88,89}, a la pràctica clínica n'hi ha molt pocs que produeixin una MHFN greu i, entre aquests, destaquen els d'especificitat anti-c i anti-K ⁹⁰.

Segons els anticossos implicats i el seu origen, hi ha diferents **formes de la malaltia**:

- **MHFN per incompatibilitat ABO**

Com ja s'ha comentat és el quadre més freqüent i sol tenir una escassa repercussió clínica malgrat que s'ha descrit algun quadre greu.

No es requereix una alloimmunització materna ja que els anticossos implicats són naturals. Pot donar-se al primer embaràs.

En la majoria dels casos es tracta de dones de grup O que tenen títols elevats d'aglutinines immunes anti-A o anti-B malgrat que també s'ha descrit en dones de grups A, A2 o B ⁹¹.

Donat que a la majoria de casos l'afectació fetal és mínima el diagnòstic d'aquesta forma de malaltia es realitza habitualment en el moment del naixement.

- **MHFN per anticossos irregulars**

Es necessita una alloimmunització de la mare en front a antígens que es troben presents als hematies del fetus i que ella no expressa. Aquesta alloimmunització pot tenir el seu origen fonamentalment a un antecedent transfusional o a un antecedent d'hemorràgia transplacentària (gestacions prèvies, avortaments,...).

En el primer cas, la malaltia pot esdevenir a la primera gestació i en el segon cas a partir de la segona gestació.

Afortunadament, a la majoria dels casos, la sospita diagnòstica es produeix durant la gestació, de manera que es pot realitzar un seguiment analític i obstètric de

la mare i si és necessària una valoració de l'estat fetal i del tractament intraúter.

No obstant, en alguns casos, en que no s'ha realitzat el control de la gestant, la malaltia es detecta en el moment del part o en el postpart.

- **MHFN per anticossos enfront de l'antigen D**

És l'especificitat més freqüentment implicada en els casos greus, però afortunadament a l'actualitat s'ha reduït la seva incidència degut a la utilització de la gammaglobulina anti-D com a mesura profilàctica de la isoimmunització anti-D ^{92,93}.

- **MHFN per anticossos enfront d'altres sistemes antigènics**

La gravetat depèn de l'anticòs implicat. Actualment, dintre de l'estudi immunohematològic habitual de control gestacional es realitza una determinació d'anticossos irregulars a totes les gestants independentment del seu RhD i aquesta circumstància ha contribuït a la detecció d'altres anticossos amb capacitat d'induir una MHFN.

A aquest grup pertanyen els anticossos d'especificitat anti-K i anti-c (**Taula 1**), els més freqüents després dels d'especificitat anti-Rh(D), i és habitual detectar-los en gestants amb antecedents transfusionals amb hematies no fenotipades per a aquest antígens ⁹⁴⁻⁹⁷. L'antigen "K" s'expressa en etapes molt inicials de la diferenciació eritroide fetal i la presència d'un anticòs anti-K provoca una eritroblastopènia fetal que pot arribar a provocar una anèmia més important que la causada per l'hemòlisi ⁹⁷.

Els fluxos migratoris de les últimes dècades han provocat l'aparició a alguns països, com és el cas d'Espanya, d'especificitats molt infreqüents fins ara, així com un increment en el nombre de casos de MHFN causats per anticossos anti-Rh(D) (escàs compliment del protocol preventiu de l'administració de gammaglobulina anti-D en gestants RhD negatives) i/o per altres especificitats menys comuns ⁹⁸.

Anticossos	MHFN
Rh(D), c C,E,e,G Ce(f), Ce, Cw, Ew, Hro, Hr, Rh29, Go ^a , Rh32, Bea, Evans, Tar, Sec, JAL, MAR-like	MHFN greu i freqüent MHFN greu i freqüent MHFN ocasional
K K, Kp ^a , Js ^a , Js ^b , U1 ^a , Ku, K22	Anèmia aplàsica > Anèmia hemolítica MHFN lleu
ABO	MHFN poc freqüent
S, s, U M En, Mi, Vw, Mur, Hut, Hil, Mt, Mv Far, sD, Or, Mut, Mur	MHFN greu MHFN excepcionalment greu MHFN greu
Fy ^a , Fy ^b	MHFN lleu, greu.
Jk ^a , Jk ^b	MHFN poc freqüent. Algun cas greu.
Co ^a , Co ^b	MHFN greu
Di ^a , Di ^b , Wr ^a , ELO, Bow	MHFN greu. Pocs casos.
Ge	MHFN poc freqüent. Inhibició eritropoiesi
HJK, Kg, REIT, JVF, JONES, MAM	MHFN greu. Pocs casos.

Taula 1. Anticossos que poden produir MHFN.

2.2.1.2. Existència de fenòmens que poden causar la immunització

Existeixen diferents fenòmens que poden desencadenar immunització:

- S'ha comprovat que en gairebé tots els embarassos es produeixen **petites hemorràgies fetomaternes**, la freqüència i el volum de les quals va augmentant a mesura que avança la gestació, fins que arriben al seu

nivel màxim en el moment del part. Determinades circumstàncies i maniobres obstètriques afavoreixen la intensitat d'aquestes hemorràgies:

- Toxèmia de l'embaràs
 - Versió cefàlica externa
 - Extracció manual de placenta
 - Avortaments espontanis i terapèutics (raspaments)
 - Embaràs ectòpic
 - Mola hidatiforme
 - Traumatisme abdominal
 - Gestació múltiple
 - Cesària
 - Tècniques invasives (biòpsia corial, amniocentesi, cordocentesi, cirurgia intrauterina,..)
 - Mort fetal
-
- La **transfusió d'hematies Rh(D) positives** a una dona Rh(D) negatiu, en altres països, en edat fèrtil pot provocar una isoimmunització capaç d'implicar, en el futur, una MHFN, habitualment de característiques clíniques més greus. Les hematies presents en altres components sanguinis (plasma, plaquetes) també poden ser immunitzants, per la qual cosa es recomana l'administració d'una dosi profilàctica de gammaglobulina anti-D (20-25 ugr/ml d'hematies). També és recomanable que les dones en edat fèrtil que puguin necessitar una transfusió rebuin hematies c-negatius i/o K-negatius si no tenen els antígens corresponents. De la mateixa manera, no s'han d'utilitzar mai les hematies de l'altre membre de la parella en el supòsit que hi hagi previsió d'un futur embaràs.

 - Altres possibles estímuls immunitzants poden tenir el seu origen al **transplantament d'òrgans i teixits** i,

més rarament, de *l'intercanvi de xeringues contaminades amb sang.*

2.2.1.3. Resposta immune materna

Dependrà de diferents factors: de la immunogenicitat de l'antigen, del volum i el nombre d'episodis hemorràgics, de la capacitat de resposta de cada gestant i del fet que s'hagi aplicat la profilaxi o no.

Cal recordar, que la incompatibilitat ABO maternofetal redueix de manera parcial les possibilitats d'alloimmunització a altres antígens.

2.2.2. TRANSFERÈNCIA PLACENTÀRIA DELS ANTICOSSOS MATERNS

El pas d'anticossos materns al fetus és un fenomen fisiològic essencial. Donat que el sistema immunològic del nou-nat no es troba del tot desenvolupat, els anticossos transferits de la mare serveixen per a protegir l'infant de les infeccions durant els primers mesos de vida.

Les 4 subclasses d'IgG (IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4) travessen la placenta i penetren en la circulació fetal, però aquest no és el cas de les molècules de classe IgM i IgA.

La transferència d'IgG és un procés actiu que es produeix en un únic sentit, de la mare cap al fetus. Malgrat que el mecanisme exacte no és ben conegut, se sap que un cop que la IgG s'uneix al receptor específic per a anticossos (FcR) placentari, entra a la cèl.lula per pinocitosi, la travessa i és alliberada a la circulació fetal.

La concentració d'IgG augmenta progressivament durant la primera meitat de la gestació, però a partir de la setmana 22-24, la concentració fetal d'IgG s'incrementa d'una manera exponencial fins que, al terme, els nivells en el fetus poden superar els materns. L'eficàcia amb que té lloc aquesta transferència pot influir considerablement en el grau d'hemòlisi i en la gravetat de la MHFN, de manera que un transport disminuït d'IgG pot donar pas a una MHFN inesperadament lleu.

L'administració de grans dosis d'immunoglobulines a una gestant contribueix a augmentar la concentració d'IgG

sèrica fetal i, probablement, a reduir la transferència d'IgG materna, un mecanisme que s'aprofita per disminuir l'hemòlisi fetal en dones altament sensibilitzades que reben aquest tractament.

2.2.3. DESTRUCCIÓ DE LES HEMATIES FETALS

Quan un aloanticòs que no fixa al complement, per exemple l'anti-Rh(D), s'uneix a l'antigen situat a la membrana eritrocitària, es produeix un fenomen de quimiotaxi mitjançant el qual les hematies sensibilitzades atrauen els macròfags. Aquesta interacció és especialment intensa a la melsa, afavorida per la circulació lenta i un hematòcrit elevat. Les hematies que superen aquesta barrera queden lesionades, adquireixen una forma esferocítica i es fan menys deformables, cosa que n'augmenta la fragilitat osmòtica i la probabilitat de lisi. Les hematies que no la superen són finalment destruïdes per mitjà d'un fenomen de fagocitosi i/o citotoxicitat exercit per monòcits, macròfags i cèl.lules "natural Killers" (NK).

Els macròfags fetals són competents per destruir les hematies sensibilitzades per IgG cap a les 22-24 setmanes de gestació, al moment just en què es transfereixen a través de la placenta els nivells més alts d'IgG.

En aquestes cèl.lules hi ha tres classes de FcR de les IgG: FcγRI, FcγRIIa i FcγRIIIa, i aquest darrer, que mostra una afinitat mitjana per les IgG, és compartit amb les cèl.lules NK. S'han descrit diversos polimorfismes en el gen que codifica per a aquest receptor però no es coneix de manera evident la relació previsible existent entre els diferents polimorfismes i la seva capacitat hemolítica o, el que és el mateix, entre aquests i el grau de gravetat de la malaltia.

S'ha comprovat que algunes gestants sensibilitzades amb un potent anti-Rh(D) i que indueixen una MHFN inesperadament lleu, solen ser portadores d'anticossos antimonòcit que, units al FcR dels macròfags fetals, aconseguen inhibir la destrucció de les hematies causada per l'anti-Rh (D) matern.

A la MHFN induïda per anti-K se sol observar discordança entre el grau d'anèmia detectat i l'hemòlisi fetal. De la mateixa manera, el títol d'anti-K pot ser paradoxalment baix. L'explicació rau en el fet que l'anti-K és capaç d'inhibir l'eritropoesi fetal donat que l'antigen "K" s'expressa en etapes inicials de la diferenciació eritroide i la presència

d'un anticòs anti-K provoca una eritroblastopènia que condueix a una anèmia molt més important del que la mateixa hemòlisi és capaç de provocar.

2.3. ESTUDI IMMUNOHEMATOLÒGIC I DIAGNÒSTIC DE LA AL·LOIMUNITZACIÓ EN GESTANTS

El control immunohematològic de les gestants, independentment de que siguin RhD positives o negatives, és obligatori i respon als següents objectius:

- Detectar de manera precoç la presència d'al·loimmunització
- Identificar les dones amb risc d'induir una MHFN
- Seleccionar les dones RhD negatiu no sensibilitzades que es poden beneficiar de l'administració profilàctica de la gammaglobulina anti-D (IgG anti-D).

Així doncs, en el transcurs de la primera visita obstètrica (8-13+6sg) cal dur a terme les següents proves analítiques a totes les gestants (**Annex 1**)⁹⁹.

- Determinació del grup ABO i Rh(D).
- Escrutini d'anticossos eritrocitaris irregulars (EAI), conegut amb el nom de Coombs indirecte, tant en dones Rh(D)-negatiu com Rh(D)-positiu.
- Genotipatge RHD fetal en cas de determinació RhD negatiu matern.

S'aconsella confrontar el sèrum/plasma de la dona amb les hematies que continguin els antígens que més habitualment es troben implicats en la MHFN, utilitzant la tècnica indirecta de l'antiglobulina (coombs indirecte): mitjà salí, incubació a 37°C i anti-IgG.

- Identificació d'anticossos irregulars quan l'EAI hagi estat positiu.

2.4. MANEIG DE LA ISOIMUNITZACIÓ MATERNA. PROTOCOL DE L'HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU.

D'acord amb els resultats obtinguts es farà un seguiment específic segons el grup sanguini Rh(D) sigui positiu o negatiu i la gestant estigui sensibilitzada o no. Així doncs, ens podem trobar amb les següents situacions:

2.4.1. GESTANT Rh(D)-NEGATIU O POSITIU NO SENSIBILITZADA

2.4.1.1. Gestants Rh (D) negatiu no sensibilitzada

Quan el EAI al primer trimestre ha donat un resultat negatiu el repetirem abans de les 28sg. L'objectiu de la prova és detectar si la gestant ha desenvolupat anticossos antieritrocitaris d'especificitat anti-RhD i si no és així (situació més freqüent) administrar la dosis profilàctica de gammaglobulina anti-D a partir de les 28sg a aquelles gestants a les que el genotipat RHD fetal ha estat positiu (**Annex 1**).

En aquells casos de gestants RhD negatives en les que no disposem de l'estudi del genotipatge RHD fetal a les 28sg (control a un centre a on no es realitza genotipatge, escàs control gestacional,...) s'administrà la dosis profilàctica de gammaglobulina anti-D.

2.4.1.2. Gestants Rh (D) positiu no sensibilitzada

Les gestants Rh (D) positiu poden produir altres anticossos diferents de l'anti-RhD. Per aquest motiu se'ls hi ha de repetir el EAI al tercer trimestre de gestació (30-34sg), doncs existeix la possibilitat que hagin produït una isoimmunització en el transcurs de la gestació, especialment si han esdevingut circumstàncies afavoridores d'una hemorràgia feto-materna: maniobres obstètriques, traumatisme abdominal o transfusió de components sanguinis. Aquest segon control es troba especialment recomanat a les dones multipares. Alguns anticossos es detecten de forma tardana i, per aquest motiu, poden no detectar-se al primer trimestre. Malgrat que el risc per al fetus és inferior, no es pot excloure totalment la possibilitat de que l'anticos pugui produir una afectació fetal.

2.4.2. GESTANT Rh(D)-NEGATIU O POSITIU SENSIBILITZADA

2.4.2.1. Gestants Rh(D) negatiu amb anticossos d'especificitat anti-RhD.

Les gestants Rh (D) negatiu amb presència d'anticossos anti-RhD ja coneguts o desenvolupats en el decurs de la

gestació es troben excloses del programa profilàctic amb gammaglobulina anti-D.

La determinació del genotip RHD fetal a plasma matern tindrà com a objectiu verificar quins casos son tributaris d'un control i seguiment especial (genotip RHD fetal positiu) i quins casos podran seguir un control habitual de la gestació (genotip RHD fetal negatiu). La identificació d'anticossos antieritrocitaris (IAI) s'ha d'acompanyar de la titulació de l'anticòs. La titulació de l'anticòs és una tècnica senzilla que ens permet valorar l'evolució de l'anticòs matern i, indirectament, la progressió de la isoimmunització materna i la potencial afectació fetal.

2.4.2.1.1. Seguiment de la gestant Rh (D) negatiu de baix risc

La classificació de la gestant Rh (D) negativa en baix o alt risc la realitzarem en funció de la titulació de l'anticòs.

- **Titulació i/o quantificació de l'anticòs matern.**

La titulació de l'anticòs (Ac) continua sent la tècnica més senzilla i a l'abast de qualsevol laboratori per valorar l'evolució de l'Ac matern. Per tal que el títol tingui valor, cal que es dugui a terme en les mateixes condicions tècniques i per part del mateix personal, sempre que això sigui factible, examinant en paral·lel la mostra actual amb la precedent. S'entén per títol crític, el títol que, un cop assolit, es pot associar a afectació fetal i, per tant, pot justificar exploracions de caràcter invasiu (cordocentesi) que ens permetin valorar d'una manera més objectiva el grau d'anèmia fetal. El **títol crític** ha canviat amb el pas del temps i, actualment, es considera que és de 32. No obstant, que molt rarament hi haurà afectació fetal si el títol es manté per sota de 128 (**títol crític de gravetat**).

Cal tenir una consideració especial en el cas d'augmentos sobtats de títol entre 2 determinacions successives, ja que un increment de títol en dues dilucions pot ser una alarma que indiqui progressió de la immunització materna i previsible afectació fetal.

La titulació dels anticossos d'especificitat anti-Rh(D) s'ha de fer, preferentment, amb cèl.lules R2R2. En canvi, la resta d'especificitats s'han de titular amb hematies heterozigots.

La tècnica d'ELAT (Enzyme-Like Antiglobulin Technique) és una opció alternativa a la titulació, que permet quantificar la concentració d'anticòs matern. Un títol de 128 és equivalent a 15 U/ml.

Així doncs, quan la gestant presenta una **titulació <32** es considera una gestant isoimmunitzada de **baix risc**. En aquests casos es pot realitzar un seguiment exclusivament serològic de la gestant repetint el EAI i la titulació mensualment fins a la setmana 28 i, posteriorment, de forma quinzenal.

Quan el títol és ≥ 32 es considerarà a la gestant d'alt risc i el seguiment l'haurà de realitzar un obstetra especialitzat. La freqüència dels controls obstètrics i serològics (EAI i títol d'anticòs) l'establirà l'obstetra de referència d'acord amb la gravetat potencial estimada per cada cas.

2.4.2.1.2. Seguiment de la gestant Rh(D) negatiu d'alt risc

Es consideraran **gestants d'alt risc**:

- Les gestants amb un títol anti-RhD ≥ 32
- Les gestants que, independentment del títol de l'anticòs, han tingut antecedents de:
 - Mort fetal intraúter relacionada amb l'anticòs RhD
 - Hidrops fetals en gestacions prèvies
 - Anèmia fetal/neonatal greu que va precisar transfusió intraúter o exsanguinotransfusió.

Aquestes gestants d'alt risc s'han de controlar a un servei d'obstetrícia especialitzat en l'atenció obstètrica i fetal per a aquest tipus de gestació. El principal objectiu del seguiment de la gestant d'alt

risc és identificar de forma precoç l'aparició d'una anèmia fetal moderada o greu.

El control obstètric que es realitza a aquestes gestants inclou les següents tècniques d'exploració:

- **Ecografia**

La presència de:

- polihidramnis (ILA >25cm), i/o
- un increment del perímetre abdominal fetal >2 DS (desviacions standard), i/o
- un augment del gruix placentari (superior a 49mm al tercer trimestre)

poden ser signes indirectes d'anèmia.

Quan el fetus té una anèmia greu (la definició d'anèmia fetal és la presència d'hemoglobina en xifres inferiors a les - 4DS respecte a la xifra que li correspondria per les setmanes de gestació) és gairebé constant la presència d'algun d'aquests signes indirectes. La presència d'hidrops es relaciona amb una anèmia fetal greu (hemoglobina inferior a 5gr/dl).

- **Estudi Doppler**

Es realitzarà amb una periodicitat de 1-2 setmanes (a partir de les 16-18 setmanes de gestació) determinant el pic de velocitat sistòlica de l'artèria cerebral mitja (PVS-ACM). Valors > 1,5 MoM s'associen de forma freqüent a anèmia greu i valors inferiors a 1,5 MoM la descarten. Estudis inicials de Mari i cols ¹⁰⁰ van estimar una sensibilitat per a una única determinació del 100% (95% IC 86-100) amb una taxa de falsos positius del 12% per a la determinació d'anèmia moderada-greu. Més tard Pretlove i cols ¹⁰¹ van publicar un ampli metaanàlisi amb una sensibilitat del 75,5% i una especificitat del 90,8% per a la detecció d'anèmia severa. La valoració de la tendència del PVS-ACM en lloc d'una mesura única, pot reduir la taxa de falsos positius almenys en un 5%. A partir de les 35 setmanes de gestació perd especificitat. És per aquest motiu que és necessària la seva valoració en conjunt amb d'altres paràmetres ecogràfics i analítics ¹⁰²⁻¹¹² .

- **Cordocentesi**

És l'única tècnica fiable i exacte per a mesurar el grau d'anèmia fetal. Té un risc de pèrdua fetal d'entre el 1-2% i fins en un 40% dels casos hi haurà pas d'hematies fetals a la circulació materna que poden agreujar el grau d'isoimmunització materna i d'afectació fetal, motiu pel qual la seva indicació s'ha d'individualitzar ¹¹³⁻¹²². L'experiència ha demostrat la bona tolerància dels fetus enfront situacions d'anèmia, inclús severes, motiu pel qual només s'indicarà la realització quan l'edat gestacional sigui inferior a les 35 setmanes ¹²³ i s'evidenciï:

- PSV-ACM > 1,5MoM amb presència d'altres signes indirectes ecogràfics d'anèmia o
- PSV-ACM >1,5 MoM amb tendència creixent

En els casos en que es realitzi la cordocentesis s'ha de realitzar disposant d'hematies compatibles preparades per a una eventual transfusió.

2.4.2.2. Gestants al·loimmunitzades amb anticossos d'especificitat no anti-RhD.

En general, per als anticossos que no són anti-RhD hi ha acord respecte a que els títols inferiors a 32 no solen estar relacionats amb afectació fetal, excepte en el cas de l'anti-K, en aquest cas títols molt baixos poden produir una afectació fetal greu ¹²⁴⁻¹²⁶. Aquesta diferència radica en la capacitat d'inhibició de l'eritropoesi fetal demostrada pels anticossos d'aquesta especificitat. Per aquesta raó, les gestants portadores d'anti-K s'han de considerar d'alt risc desde el moment en que s'identifica l'anticòs i, més encara, quan el títol és \geq a 8.

Després de l'anti-D i l'anti-K, els anticossos d'especificitat anti-Rh(c) i, molt per darrera, els d'especificitat anti-Rh (E), també poden produir afectació fetal greu quan el seu títol es troba per sobre de 32.

En el cas d'altres anticossos, malgrat el risc d'afectació fetal és menor i, habitualment, de caràcter lleu-moderat, és important reconèixer el significat clínic de cada anticòs per

a planificar el programa de control i seguiment de la gestant més adequat en cada cas.

2.5. PROFILAXI DE LA ISOIMMUNITZACIÓ Rh(D)

La profilaxi de la isoimmunització es realitza amb la immunoglobulina Anti-D (Rho) que és un medicament en solució injectable, intramuscular, estèril i no pirogènica que conté anticossos específics contra l'antigen D (anti-D Rho) del tipus immunoglobulina G (IgG) d'origen humà (300 µgrs) ¹²⁷.

Per a la seva elaboració es fa servir una barreja de plasma de donants RhD negatiu sensibilitzats amb l'antigen D. La IgG és purificada de la barreja de plasma per fraccionament alcohòlic mitjançant els mètodes 6 i 9 de Cohn i Oncley. Al procés s'inclou un mètode específic d'inactivació/remoció viral: nanofiltració amb una membrana de 35nm d'efectivitat provada contra virus capsulats i no capsulats.

La seguretat, potència i puresa es realitzen i controlen segons les recomanacions de l'Organització Mundial de la Salut. Malgrat això, no es pot excloure totalment la transmissió d'agents infecciosos. Sobretot virus o agents infecciosos emergents o de natura desconeguda en l'actualitat.

A més a més, l'administració de la gammaglobulina anti-D pot donar lloc a reaccions d'hipersensibilitat ¹²⁸ malgrat ser poc freqüents. Per aquesta raó, les gestants han d'estar informades sobre els signes inicials de les reaccions d'hipersensibilitat que inclouen erupció cutània, urticària generalitzada, opressió toràcica, dificultat respiratòria, hipotensió i anafilaxia.

El metge sempre ha de valorar el benefici del tractament amb gammaglobulina anti-D en front els riscos potencials de reaccions d'hipersensibilitat.

És altament recomanable que cada vegada que administrem gammaglobulina anti-D a una pacient deixem constància del nom i nombre de lot administrat amb la finalitat de poder mantenir una relació entre la pacient i el lot.

Així doncs, hem de recordar que la gammaglobulina anti-D és un derivat humanoide no exent de riscos i que només s'hauria d'administrar en casos totalment justificats.

Està indicada l'administració de gammaglobulina anti-D en gestants RhD negatiu, no sensibilitzades:

- 300 µgrs, durant les 72 hores posteriors al part d'un fetus RhD positiu.
- 300 µgrs, en la setmana 28 de gestació.
- 300 µgrs, durant la primera meitat de l'embaràs en totes les dones que pateixen un avortament espontani o induït, un embaràs ectòpic o hemorràgia vaginal de probable origen uterí.
- 300 µgrs en totes les exploracions que comporten un risc d'hemorràgia transplacentària (HTP): biòpsia de còrion, amniocentesi, funiculocentesi, versió cefàlica externa, traumatisme abdominal, etc...
- Es recomana aplicar un test de Kleihauer o una tècnica equivalent sempre que hi hagi sospita d'una HTP durant la gestació o el postpart (per exemple: placenta prèvia o desprendiment prematur de la placenta) per ajustar la dosi d'IgG anti-D i augmentar-la si es detecten més de 30ml de sang fetal.

2.6. GRUP RHESUS D (RhD) FETAL

2.6.1. GENÈTICA DEL SISTEMA RH

El grup sanguini conegut com el sistema Rhesus (Rh) inclou els 5 antígens rhesus més importants (C, c, D, E, e) que es troben situats a la superfície de la membrana dels eritròcits. El RhD és el més comú i sol indicar-se com a sufix positiu o negatiu del tipus de sang ABO degut a la seva elevada immunogeneïtat.

2.6.1.1. La base molecular dels al·lels RH

L'expressió de l'antigen Rh implica dos gens, RHD i RHCE (Figura 2), ubicats al cromosoma 1p34-36, amb una localització propera entre ambdós, i la coexpressió essencial d'una glicoproteïna associada a Rh (RhAG), el gen codificador de la qual es troba ubicat al cromosoma 6p11-21.1 ¹²⁹.

El primer gen Rhesus, el gen RHCE, va ser descobert l'any 1990 i dos anys després va tenir lloc el descobriment del

gen RHD. Va ser arrel d'aquesta darrera troballa que es va concloure que la delecció total d'aquest gen era la causa del fenotip D negatiu a la població europea ¹³⁰.

L'any 2002, les comparacions realitzades entre el Projecte del Genoma Humà i el Projecte del Genoma de Mamífers van augmentar la comprensió de la formació dels gens RH al cromosoma 1 ¹³¹.

La majoria dels mamífers només tenen un gen RH, la posició del qual correspon al gen humà RHCE. El gen RHD va sorgir de la duplicació d'un gen ancestral de RH durant l'evolució dels mamífers ¹³²⁻¹⁴⁰. L'eliminació de RHD en el transcurs de l'evolució del homínids va ser el motiu pel qual molts humans de l'actualitat no tenen rastre del gen RHD ¹⁴¹⁻¹⁴⁸. Aquest haplotip és la causa principal del fenotip D negatiu a tot el món (*Figura 2*).

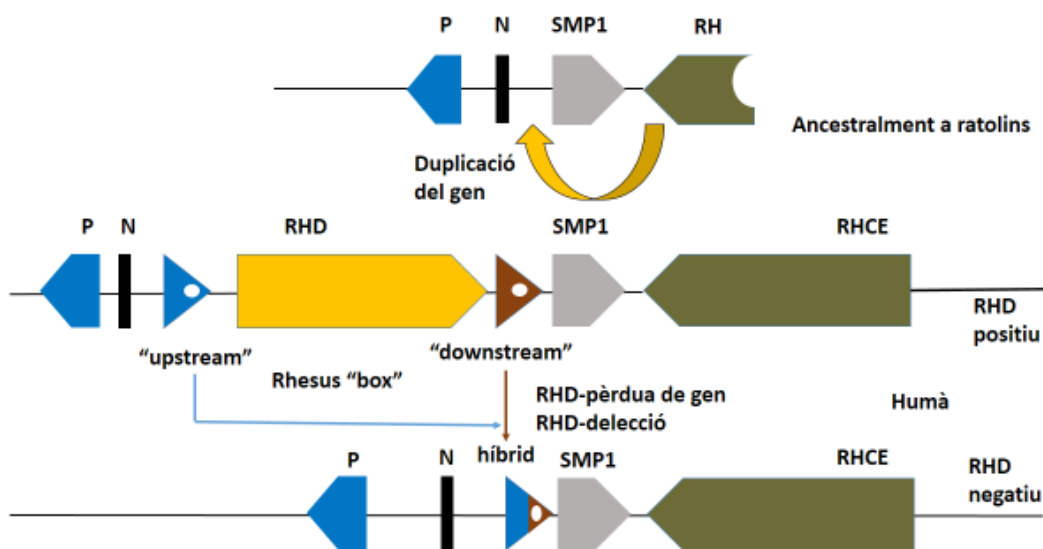


Figura 2. Duplicació del gen RH i eliminació del gen RHD. La condició ancestral es mostra com el locus del gen RH al ratolí. L'únic gen RH es troba adjacent als tres gens: SMP1, proteïna associada a P29 (P) i NPD014 (N). La duplicació va crear un segon gen RH invertit en humans que es troba entre N i SMP1. Els punts d'inserció d'abans i després del gen RHD són uns segments d'ADN de al voltant de 9000 nucleòtids o parells de bases de llarg. Els dos segments d'ADN que limiten amb el gen RHD i que es troben davant i darrera d'ell es denominen quadre Rhesus ("Rhesus box"). A l'haplotip positiu RHD, el gen RHD podria perdre's novament a través de la recombinació (*figura 4*).

Ambdós gens tenen 10 exons i comparteixen el 94% d'identitat de seqüència. El gen RHD codifica la proteïna RhD i el gen RHCE codifica la proteïna RhCE. La proteïna RhD porta l'antigen D (RH1) i la proteïna RhCE porta els antígens C o c i E o e (RH2-RH5) ¹⁴⁹.

Fins ara, s'han descrit 251 al·lels RHD i 123 al·lels RHCE i s'han identificat més de 50 antígens al sistema del grup sanguini Rh.

Els al·lels RH es poden agrupar segons la seva estructura molecular. La gran majoria mostren mutacions puntuals (SNP, polimorfismes d'un sol nucleòtid) que causen:

- “missense”: és la substitució d'aminoàcids en una proteïna causada per un punt de mutació. Pot alterar la funció o antigenicitat d'una proteïna.
- “nonsense”: és un codó d'aturada causat per una mutació puntual que deté prematurament la síntesi de la cadena d'aminoàcids, portant a la pèrdua de la funció proteica de la seva expressió.
- “frame shift”: és la pèrdua o inserció d'un o dos nucleòtids que canvia el marc de lectura i atura prematurament la síntesi de la proteïna (o l'augmenta en alguns pocs casos), el que resulta en pèrdua de la funció o de l'expressió proteica.
- “splice site mutations”: és una mutació puntual en un lloc d'entroncament (la unió exó-intró), causant un entroncament defectuós d'ARN missatger (ARNm) i saltant un exó, canviant així la seqüència d'aminoàcid. Conduïx a la pèrdua de la funció o expressió de la proteïna.

Els al·lels híbrids RHD-CE-D sovint estan formats per la conversió de gens.

Els exemples de canvis moleculars i els seus efectes sobre l'antigen D (*Taula 2*) mostren com el fenotip de l'antigen D es correlaciona amb la seva base molecular.

Classificació del canvi de l'antigen	Fenotip d'antigen D	Base molecular		Exemple representatiu		Nou antígen rhesus
		Alteració de la proteïna	Mecanisme	Descripció de l'al·lel RHD	Nom comú	
D parcial	Alterat qualitativament	- Substitució d'aminoàcid superfície externa - Proteïna híbrida	Mutació "missense" Gen de conversió	RHD(G355S) RHD-CE(3-6)-D	DNB DVI-tipus 3	Desconegut BARC
D feble	Quantitativament atenuat	Substitució d'aminoàcid a la membrana o al medi extracel·lular	Mutació "missense"	RHD(V270G)	D feble tipus I	Desconegut
DEL	Quantitativament atenuat de forma molt notable	Traducció molt reduïda	Mutació "missense" RHD(K409K) of splicing	RHD (M2951) in C De	Sense assignar	Desconegut
D negatiu	D negatiu	Absència d'expressió proteica Proteïna híbrida: canvi al segment proteic de la superfície externa	Delecció del gen Mutació "nonsense" Mutació amb desplaçament de la pauta de lectura Gen modificat Conversió de gen	RHD delecció RHD (Y330X) RHD (488 del 4) Defecte al gen RHAG RHD-CE(4-7)-D	D negatiu Sense assignar Sense assignar Rh Cde	Impossible
Antigen de proteïna RHCE antitètic	Presència de l'antigen E o e	Mutació "missense" produïda a un aminoàcid amb localització 226 per a l'antigen E	Mutació "missense" a l'aminoàcid amb posició 226 a RHCE	Al·lel RHCE: codi "ala 226" per a l'antigen "e", codi "Pro 226" per a l'antigen "E"	Sense assignar	E versus e

Taula 2. Efectes dels canvis mol·leculars sobre l'antigen "D".

2.6.1.2. La base molecular dels fenotips Rhesus

Les dues proteïnes Rhesus, RhD i RhCE, són molt similars ja que difereixen únicament en 36 dels 417 aminoàcids que les formen. Cadascuna té dotze segments dintre de la

membrana eritrocitària i sis bucles extracel.lulars (**Figura 3**). Tant el terminal amino (NH₃) com el carboxil (COOH) es troben ubicats a l'interior de la cèl.lula ¹⁵⁰.

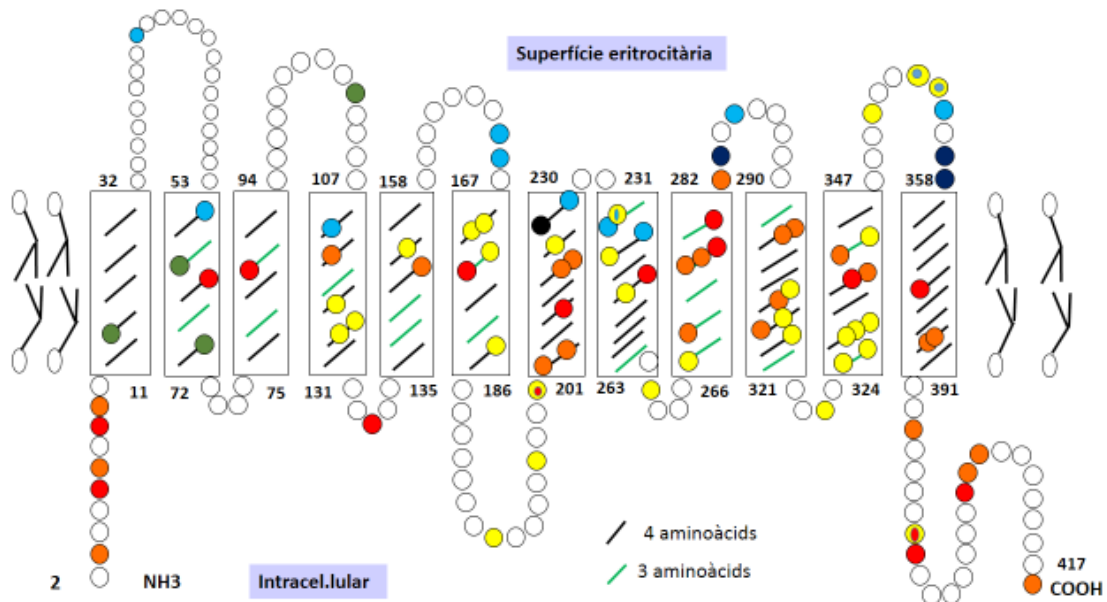


Figura 3. La proteïna Rhesus a la membrana dels eritròcits. Ambdues proteïnes Rhesus mostren 417 aminoàcids que s'il.lustren a la figura com a cercles. Les proteïnes madures a la membrana no tenen el primer aminoàcid. Les substitucions d'aminoàcids que diferencien la proteïna RhD de la RhCE es troben codificades de groc, amb els 4 aminoàcids que codifiquen l'antigen C en verd i el que codifica per l'antigen E en negre. Les substitucions d'un sol aminoàcid que codifica per al D parcial es troben marcades en blau, aquelles que codifiquen per al D dèbil en vermell. Les mutacions, identificades pel grup de Ulm, es poden visualitzar en color blau clar i taronja.

2.6.1.2.1. Fenotip D negatiu

La diferència clínicament essencial entre Rhesus positiu i Rhesus negatiu depèn de la presència o absència de la proteïna RhD a la membrana dels eritròcits.

Com ja hem comentat amb anterioritat, durant la duplicació del gen ancestral RH, es van formar dos segments d'ADN, coneguts com a caps Rhesus ("Rhesus box") (**Figura 2**). La delecció del gen RHD va derivar en una *desigualtat creuada* ("unequal crossover") (**Figura 4**) que es produeix quan dos

segments d'ADN són altament homòlegs, com els de la capsa Rhesus. A l'actualitat, l'haplotip negatiu RHD més comú entre els europeus es caracteritza per una capsa Rhesus híbrida. De fet, les diferències moleculars subtils entre les diverses formes de la capsa Rhesus es fan servir per a realitzar certs tests genètics.

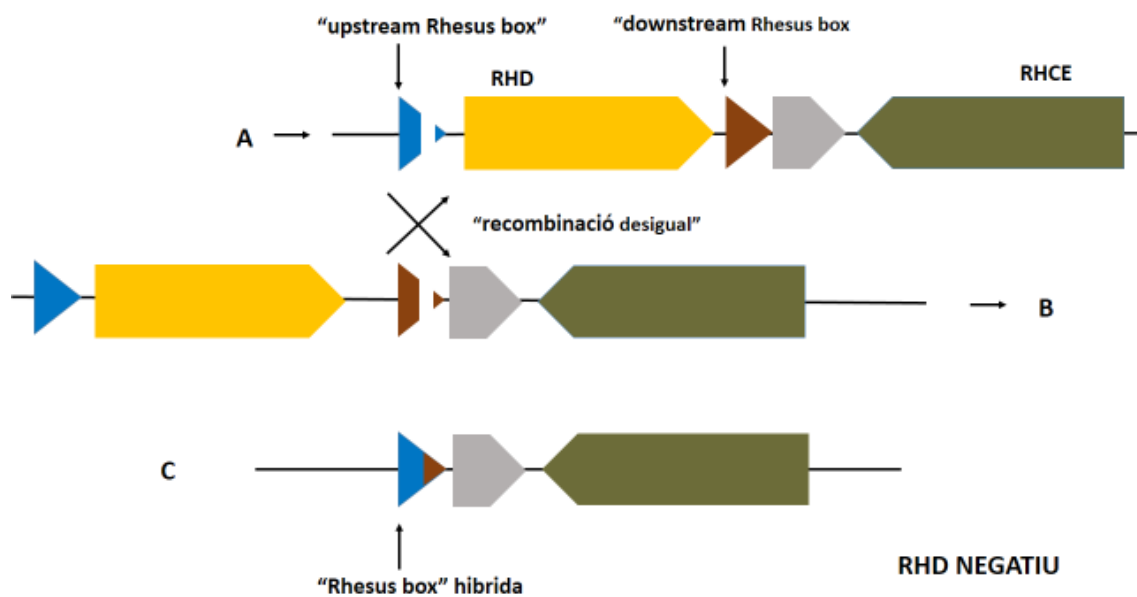


Figura 4. Delecció del gen RHD. La delecció del gen RHD va sorgir de la recombinació entre el "upstream" (direcció 5') i el "downstream" de la capsa Rhesus en 2 cromosomes diferents. Això s'anomena recombinació desigual ("unequal crossover"). Quan les dues porcions recombinades es separen (des d' A sobre el lloc de recombinació B) l'ADN al lloc del gen RH manca per complert del gen RHD (C). Aquest haplotip (C) es produeix aproximadament en el 41% de la població. Un individu homocigot per a aquest haplotip (al voltant del 17% ho són) és D-negatiu.

A la natura és inusual que les proteïnes eritrocitàries o altres proteïnes cel·lulars estiguin totalment absents en molts éssers humans. Aquesta particularitat genètica contribueix a la fort antigeneïtat de la proteïna RhD.

La freqüència del fenotip D negatiu és del 15-17% a les poblacions amb descendència europea, del 5% a l'Àfrica i del 3% a Àsia.

Així com a la població europea la causa més freqüent de presentar un fenotip RhD negatiu és la delecció completa del gen RHD, a la població africana un fenotip D negatiu sol associar-se a la presència d'un gen híbrid o d'un pseudogen RHD (RHD ψ) que no codifica una proteïna funcional (*Figura 5*).

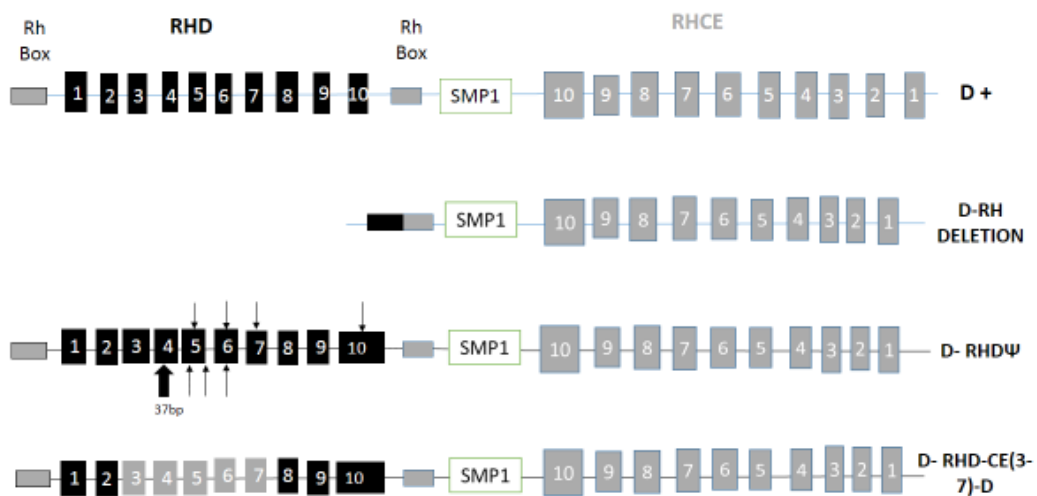


Figura 5. Diagrama d'haplotips RH. (A) RHD positiu que dona lloc al fenotip RhD positiu. (B) Absència del gen RHD dona lloc al fenotip D negatiu. (C) Presència de mutacions al pseudogen RHD ψ (fletxes negres) donen lloc al fenotip D negatiu. (D) Gen híbrid RHD-CE-D que dona lloc a fenotip D negatiu.

El pseudogen RHD ψ conté 37 parells de bases inserides a l'exó 4 que poden produir un stop al codó a la posició 210. El material introduït és una duplicació de seqüència a través del límit de l'intró 3 i de l'exó 4. A més a més, el pseudogen RHD ψ conté un altre codó de stop a l'exó 6.

Entre els individus africans D-negatius, aproximadament el 66% són portadors del pseudogen RHD ψ i el 15% de l'al·lel híbrid RHD-CE-Ds.

2.6.1.3. La base molecular de les variants de l'antigen D

A banda de la manca de la proteïna RhD, el fenotip D negatiu és causat principalment per tota una sèrie de canvis a la proteïna RhD, que al seu torn canvia el fenotip de l'antigen D ¹⁵¹⁻¹⁶¹.

Depenent del fenotip i la seva estructura molecular aquests al·lels RHD es classifiquen com a D parcial, D feble o DEL.

2.6.1.3.1. D parcial

La proteïna RhD travessa la membrana eritrocitària diverses vegades deixant només una part de la proteïna exposada a la superfície (**Figura 3**). Si un aminoàcid és substituït en una porció de la proteïna RhD que es troba a la superfície exterior de la membrana eritrocitària, epítops únics de l'antigen D es poden perdre o poden formar nous antígens. DNB és el D parcial europeu més comú (**Taula 2**).

Les categories D són un subgrup del D parcial. L'estructura de la localització del gen RH afavoreix les conversions dels gens (**Figura 6**). Al gen RHD s'insertaran alguns exons homòlegs del gen RHCE, formant un al·lel Rhesus híbrid que expressarà la seva proteïna híbrida corresponent. Així és com les categories D tipus III-VI van sorgir. Els canvis habitualment afecten a una llarga cadena d'aminoàcids que sempre es troba a la superfície dels eritròcits.

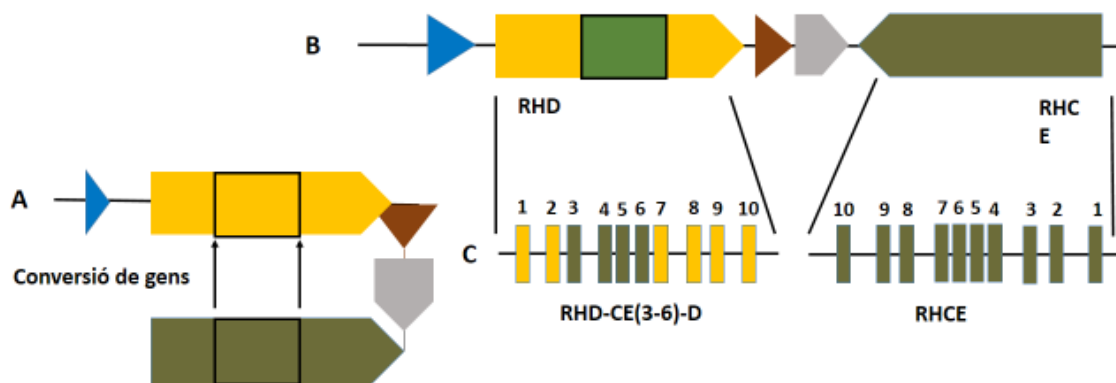


Figura 6. Categoria DVI com a resultat de la conversió de gens. Els dos gens RH es troben apuntant a direccions oposades (p.ex: cluster,...). Quan el cromosoma es plega, els dos gens RH queden adjacents, apuntant en la mateixa direcció. Aquesta configuració permet la conversió de gens en “cis”, motiu pel qual un segment de l’ADN es transfereix d’un gen a l’altre. La meitat de la secció del gen RHD (groc) es substitueix per la corresponent secció homòloga del gen RHCE (verd) (A). Aquest tipus de conversió gènica és responsable de l’al·lel RHD-CE (3-6)-D, que codifica per a la categoria VI D del tipus molecular 3 (DVI tipus 3) (B). Els exons de 1 a 10 es troben en ambdós gens RH(C). Degut a les direccions contràries, els exons terminals dels dos gens RH (RHD i RHCE exó 10) es troben més propers un de l’altre. Al gen RHD, els exons del 3 al 6 són substituïts pels exons homòlegs del gen RHCE.

2.6.1.3.2. D feble

Si la substitució d’un aminoàcid es troba dintre de la membrana eritrocitària o del citoplasma això donarà lloc a un fenotip D feble (**Figura 3**)⁴¹. La integració de la proteïna RhD a la membrana es veurà obstaculitzada, el que portarà a un debilitament quantitatiu de l’antigen D. Normalment, no hi ha canvis qualitatius i, per lo tant, no hi ha immunització anti-D. Els tipus D feble tenen una freqüència d’entre el 0.2 al 1% a les poblacions d’ascendència europea. El tipus D feble 1 és el més comú a Europa (**Taula 2**).

2.6.1.3.3. DEL

Un antígen D expressat particularment de forma feble rep el nom de DEL (prèviament Del) perquè únicament podria demostrar-se fent servir elució. A l'elució, els anticossos es separen dels eritròcits. Els canvis moleculars són més severos que els observats amb el D feble, dificultant considerablement però no per complet la seva integració a la membrana cel·lular. Tots els al·lels DEL són molt poc freqüents a Europa però fins al 30% de tots els individus aparentment D negatius a l'est d'Àsia són portadors de l'al·lel DEL RHD (K409K) ⁴¹⁻⁴³. La freqüència DEL a la població europea és de 1: 350-1: 2000.

2.6.1.4. Els antígens C/c i E/e

Els antígens Rhesus clínicament importants C, c, E i e són el resultat dels canvis produïts a la proteïna RhCE únicament a la zona de cinc aminoàcids (**Figura 3**). Els antígens reben el nom d'antitètics si una proteïna es pot presentar únicament en un d'ells. El seu origen es troba als polimorfismes proteïcs. Sovint hi ha dos variants d'una proteïna que difereix només en l'ubicació d'un sol aminoàcid com els antígens Rhesus E i e. Els al·lels RHCE que mostren l'aminoàcid prolina a la posició 226 expressen l'antigen E, mentre que els al·lels RHCE que mostren l'aminoàcid alanina en aquesta posició expressen l'antigen e (**Taula 1**).

Diferències similars entre els dos al·lels RHCE donen lloc als antígens c i antitètic C. El parell d'antígens C/c i E/e no són antitètics, bàsicament perquè són el resultat de substitucions a diferents localitzacions. Les quatre possibles combinacions es donen amb freqüències diferents (entre els europeus: Ce > ce > cE > CE) i s'hereden com haplotips.

2.7. DETERMINACIÓ NO INVASIVA DEL GENOTIP RHD FETAL

2.7.1. PRESENCIA DE cfDNA EN SANG MATERNA

L'ADN lliure de cèl.lules (cfDNA) present a la sang prové de les cèl.lules apoptòtiques. En el cas de les gestants podem trobar dos tipus d'ADN lliure (cfDNA):

- **ADN lliure de cèl.lules matern**: provinent de l'apoptosi dels leucòcits.
- **ADN lliure de cèl.lules fetal (cffDNA)**: provinent de l'apoptosi de les cèl.lules placentàries (sincitiotrofoblast).

L'any 1997 Lo i els seus col.laboradors van descobrir que aproximadament entre un 3-6% de l'ADN lliure de cèl.lules circulant al plasma matern de les gestants era d'origen fetal (cffDNA) ²⁶.

El cffDNA pot aïllar-se a sang materna a partir de la cinquena setmana de gestació i la seva concentració augmenta amb l'edat gestacional ²⁷⁻²⁸ essent aquest augment moderat fins a la setmana 21 (0.1% per setmana) per augmentar de forma més ràpida a posteriori (1% per setmana) fins al terme ^{31,162-163}.

El cffDNA habitualment representa el 10-15% total del cfDNA a la circulació materna cap al final del primer i començament del segon trimestre, fins arribar a un 50% del total del cfDNA circulant a sang materna al final de la gestació ¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. Després del moment del part el cffDNA desapareix de la circulació materna en 1 o 2 dies.

2.7.2. MÈTODE DE DETERMINACIÓ NO INVASIVA DEL GENOTIP RHD FETAL A SANG MATERNA

L'any 1998 van ser novament Lo i els seus col.laboradors ^{27,28} els que a partir de la detecció del cffDNA en sang materna van descriure la mètode per a la detecció no invasiva del gen RhD fetal basat en la tècnica de PCR a temps real al plasma de les gestants RhD negatives.

De fet, la determinació del genotip RHD fetal a plasma matern de les gestants RhD negatives va ser una de les primeres aplicacions a la pràctica clínica del diagnòstic

prenatal no invasiu (NIPD) tant renombrat a dia d'avui per la detecció precoç d'aneuploidies fetals ¹⁶⁷⁻¹⁷¹.

Aquesta forma de diagnòstic no invasiu va suposar l'inici d'una nova era en el camp del diagnòstic prenatal ja que deixava de banda la necessitat de realitzar proves invasives (amniocentesi, biòpsia corial, cordocentesis,..) amb l'objectiu de conèixer el RhD fetal. Això va ser important perquè a més a més d'estalviar-se el risc de pèrdua fetal que implicaven també s'evitava el risc d'hemorràgia transplacentària que tenia lloc al 17% de tots els casos de tècniques invasives, tal i com ja hem explicat amb anterioritat.

La possibilitat de conèixer el genotip RHD fetal a partir d'una mostra de plasma matern és probablement l'avenç més important a la història de la MHFN després de la introducció de la profilaxis amb la gammaglobulina anti-D.

Com ja he comentat, l'any 1998 es va descriure la primera tècnica per a determinar el genotip RHD fetal ¹⁷² a partir de plasma matern. Des d'aleshores s'han elaborat i validat diferents protocols amb aquesta aplicació, tots ells amb uns resultats que evidenciaven un elevat grau de fiabilitat ¹⁷³⁻¹⁷⁸.

Actualment, la majoria dels laboratoris fan servir la tecnologia de reacció en cadena de la polimerasa (PCR) quantitativa a temps real amb sondes específiques per a una o varies regions del gen RHD ¹⁷⁹.

El patró d'amplificació detectat mitjançant aquesta tècnica quantitativa permet distingir fàcilment l'amplificació de l'ADN d'origen fetal respecte a una possible amplificació d'un gen RHD silent matern, una circumstància que es dona a la població caucàsica amb una freqüència relativament baixa (2-3%) però que augmenta significativament si s'analitza població multiètnica ¹⁸⁰.

Aquest fet també condiciona l'estratègia que es fa servir, ja que hi ha aproximacions a les que el disseny de les regions del gen RHD que s'analitzen a l'ADN del plasma permet distingir els al·lels RHD silent majoritaris a la població de raça negra.

Així doncs, per a determinar l'estatus RhD fetal és important poder diferenciar entre les seqüències RHD funcionals i les no funcionals. Com ja hem comentat amb anterioritat, la delecció del gen RHD és la causa més comú de fenotip RhD negatiu a les poblacions caucàsiques. No obstant, la majoria de les persones de raça

negra RhD negatives són portadores d'un al·lel RHD Ψ (freqüència d'al·lel 0.0714) o (C)cde (freqüència d'al·lel 0.036) ¹⁸¹⁻¹⁸³.

En ambdós al·lels, les seqüències específiques de RHD estan presents però degut a la presència d'un codó de terminació de traducció (RHD Ψ) o a la substitució de seqüències codificants específiques de RHD per a seqüències de codificació específiques de RHCE ((C)cde), no es detecten epítops D presents a la superfície dels glòbuls vermells fetals. Finning i els seus col·laboradors van desenvolupar una estratègia de tipatge RHD fetal que únicament detecta RHD (i no RHD Ψ ni (C)cde) a l'ADN fetal present al plasma matern ¹⁷³.

Amb aquesta estratègia, els exons RHD 4, 5 o 6 són amplificats a temps real i es comparen amb l'amplicó de control de l'exó 10 de RHD. Quan està present l'al·lel RHD ψ o (C)cde els exons 4, 5 o 6 no s'amplificaràn (en el cas d'un al·lel RHD ψ degut a la inserció de 37pb al límit de l'intró 3 exó 4 i a la substitució de nucleòtids de RHD a RHCE als exons 5 i 6; en el cas d'un al·lel (C)cde degut a l'absència dels exons RHD 4,5 i 6) mentre que l'exó 10 s'amplificarà.

Per altra banda, el tamany del producte de PCR és de gran importància quan l'estratègia de PCR es troba dissenyada per a detectar ADN cel·lular lliure fetal al plasma matern ja que el seu tamany oscil·la entre els 145 i les 201 pb.

El mètode que fan servir al International Blood Group Reference Laboratory (IBGRL) del National Blood d'Anglaterra és una modificació del de Finning et al. Incorpora encebadors i sondes Taqman per a detectar, mitjançant PCR en temps real, exons 4,5 i 10 de RHD, però no RHCE. La reacció de l'exó 10 també detecta RHD Ψ i RHCE-D-CES, però les reaccions a l'exó 4 i 5, com ja he comentat amb anterioritat, no detecta aquests dos gens africans "D-negatius".

Així doncs, tenint en compte la peculiaritat del gen RHD al realitzar la determinació del genotip RHD fetal en plasma matern hem d'evaluar com a mínim dos regions per a confirmar la presència de RHD. El treball original de Bennet et al ¹⁸⁴ i Wolter et al ¹⁸⁵ suggereixen que la tipificació RHD ha d'incloure els exons del 4 al 5 i el 10. Una prova per a descartar la presència de RHD ψ ha d'acompanyar a la prova per a la detecció de RHD fetal ¹⁸⁶⁻¹⁸⁹. A la **Taula 3** es troben reflexats els principals exons analitzats pels diferents grups ¹⁹⁰.

Grup	Mostra (n)	Edat gestacional (mitjana)	Exons RHD	No concloents	Falsos positius	Falsos negatius	Sensibilitat (%)	Especificitat (%)
Assaigs clínics a gran escala de genotipat RHD fetal								
<i>van der Schoot et al (58)</i>	1268	30	7	15	5	3	99.62	98.92
<i>Finning et al (35)</i>	1869	8-28 (28)	5,7	64	14	3	99.73	97.95
<i>Müller et al (36)</i>	1022	6-32 (28)	5,7	0	3	2	99.70	99.17
<i>Akelokar et al (40)</i>	586	11-13	5,7	84	0	6	98,22	100
<i>Wikman et al (34)</i>	3291	8-40 (10)	4	13	14	23	98.89	98.4
<i>Chitty et al (42)</i>	865	<11	5,7	111	1	16	96.15	99.70
	956	11-13		75	4	1	99.81	98.84
	542	14-17		43	1	1	99.63	99.56
	888	18-23		69	5	1	99.80	98.47
	1662	>24		95	7	0	100	99
<i>Moise et al (59)</i>	467	11-13	4,5,7	26	2	1	99.68	98.46
	458	16-19		26	2	0	100	98.47
	425	28-29		26	1	0	100	99.18
<i>Soothill et al (60)</i>	509	15-17	5,7	61	1	0	100	99.42
<i>Vivanti et al (61)</i>	416	10-14	10	9	7	0	100	95.48
Programes nacionals de detecció de RHD fetal amb immunoprofilaxi dirigida								
<i>Clausen et al (62)</i>	12688	25	5,7;7,10 o 5,10	274	41	11	99.86	99.14
<i>De Haas et al (63)</i>	25789	27-29	5,7	0	225	9	99.94	97.74
<i>Haimila et al (64)</i>	10814	24-26	5,7	86	7	1	99.99	99.81
Resultats recopilats de tots els estudis								
<i>Total 11-13sg</i>	5716	11-13		207	27	31	99.12	98.65

Taula 3. Resultats del genotipat RHD fetal

La inclusió d'un marcador al cromosoma Y (seqüència del gen SRY unit al cromosoma Y) permet evaluar l'eficiència del procediment d'extracció d'ADN i confirmar la presència d'ADN fetal de sexe masculí present al plasma matern.

Així doncs, la majoria de tècniques de PCR per a la determinació del genotip RHD fetal realitzades a plasma matern consisteixen en una PCR doble (duplex/multiplex)

per a RHD (incloent sempre l'estudi de 2 exons) i SRY (Figura 7).

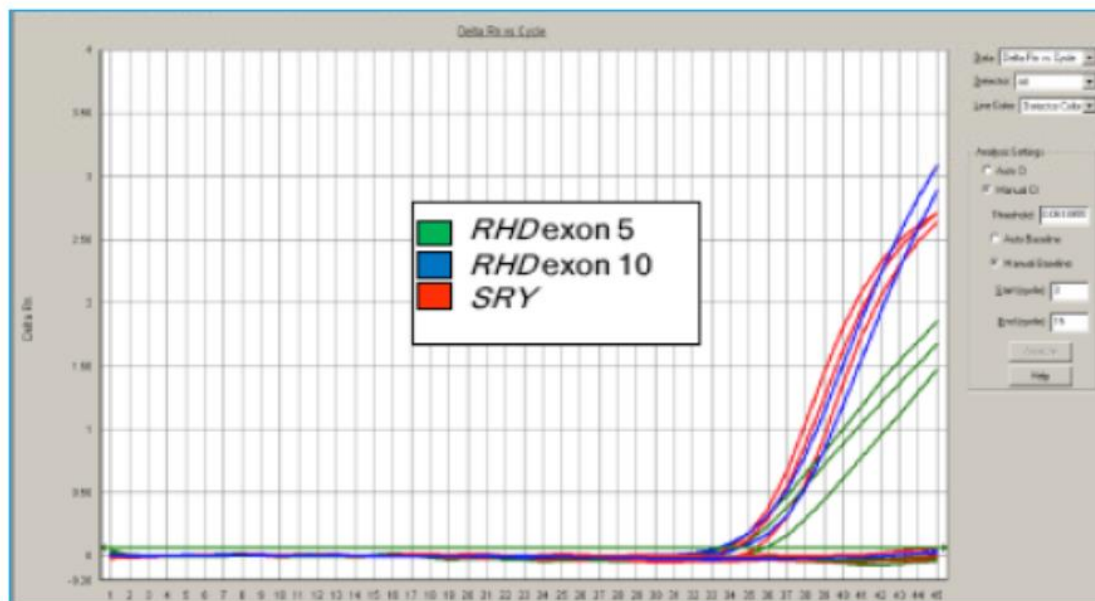


Figura 7. Detecció del gen RHD fetal mitjançant PCR a temps real a partir de l'ADN de plasma corresponent a una gestant RhD negatiu portadora d'un fetus masculí RhD positiu.

3. JUSTIFICACIÓ DE L'ESTUDI

La malaltia hemolítica del fetus i el nou-nat (MHFN) continua sent una complicació present al nostre medi amb una morbiditat perinatal associada no menyspreable si no duem a terme un maneig adient durant la gestació. La causa més freqüent de MHFN és la isoimmunització contra l'antigen RhD eritrocitari. La incompatibilitat RhD afecta a aproximadament un 12% de les parelles del nostre medi i per aquest motiu té una gran importància en el decurs de la gestació ^{146,180}.

Actualment, la isoimmunització anti-D es continua detectant amb una freqüència més elevada del que caldria esperar sent un fenomen susceptible de poder-se evitar amb la correcta administració de gammaglobulina anti-D a les dosis establertes i respectant el calendari programat durant el control gestacional.

En els darrers anys, s'han produït avenços tecnològics importants en l'àmbit del laboratori i de la clínica obstètrica que han fet millorar notablement el diagnòstic, el tractament i la prevenció de la MHFN. La possibilitat de conèixer el genotip RHD fetal a partir d'una mostra de sang materna és probablement l'avenç més important en la història d'aquesta malaltia, després de l'introducció de la profilaxi amb la gammaglobulina anti-D.

La incorporació d'aquesta prova diagnòstica ha representat un pas endavant important en el maneig de les gestants immunitzades donat que en aquells casos en els que el genotip fetal RHD és negatiu els controls gestacionals seran els habituals donat que el fetus no tindrà risc de MHFN i això té implicacions molt importants no només desde el punt de vista de despesa econòmica (l'exhaustiu control en dones amb fetus amb risc de MHFN impliquen moltes visites i proves complementàries) sino que el fet de transmetre a la parella que el seu fill no tindrà risc de MHFN i disminuir d'aquesta manera la seva angoixa és un fet de vital importància a dia d'avui.

A més a més, la determinació del genotip RhD fetal ens obre la possibilitat, fins ara inexistent, de realitzar una immunoprofilaxis dirigida i administrar la gammaglobulina anti-D únicament a aquelles gestants RhD negatives que siguin portadores d'un fetus RhD positiu. Aquest fet evita l'administració d'un derivat humanoide com és la gammaglobulina anti-D a tot un grup (al voltant del 40% de les gestants RhD negatives) evitant així no únicament el seu cost econòmic sino els possibles riscos biològics (virus o prions que amb les actuals tècniques de laboratori no es poden detectar).

Així doncs, el nostre objectiu amb el següent estudi és demostrar que la determinació del genotip RHD fetal prenatal a les gestants RhD negatives, segons el protocol utilitzat en aquest centre, és eficient i eficaç a la pràctica clínica diària i avaluar si el cost-benefici associat a la incorporació d'aquesta prova faria viable la seva implementació universal.

4. HIPÒTESI

La determinació no invasiva del genotip RHD fetal a partir del plasma matern és, avui dia, una prova robusta, sensible i fiable, que ha estat validada en múltiples estudis a gran escala en diferents poblacions europees. A Catalunya, l'experiència acumulada en els darrers 15 anys en la genotipificació RHD fetal no invasiva avala la implementació rutinària d'aquesta prova a totes les gestants RhD negatiu. La tecnologia disponible avui dia és altament sensible i permet detectar seqüències de cffDNA amb una baixa representació de la fracció fetal en plasma matern. En base a aquestes premises, aquest treball de tesi es planteja la següent hipòtesi:

La determinació del genotip RHD fetal en plasma matern en gestants RhD negatiu realitzada durant el primer trimestre, es pot aplicar de forma universal a la nostra població?

5. MATERIAL I MÈTODES

5.1. DISSENY DE L'ESTUDI

Aquest és un estudi observacional retrospectiu realitzat sobre una cohort de gestants RhD negatives controlades al nostre centre hospitalari (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona (HSPSC)) a les que es va determinar el genotip RHD fetal durant el primer trimestre de la gestació.

Prèviament a l'inici de l'estudi, es va obtenir l'aprovació del Comitè Ètic d'Investigació Clínica (CEIC) del centre per a la seva realització (codi de registre al CEIC: IIBSP-RHD-2016-18) així com la conformitat de la direcció del centre (**Annex 5 i 6**). A més a més, l'estudi es va registrar a una extensa base de dades denominada ClinicalTrials.gov (numero de registre: NCT02788383). Aquesta base de dades del Servei Nacional de Salut dels Estats Units recull la majoria dels estudis clínics realitzats en éssers humans a tot el món.

5.1.1. Pacients

Al Gener del 2013 el nostre centre (Servei de Ginecologia i Obstetrícia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau) en col.laboració amb el Banc de Sang i Teixits va posar en marxa una guia de pràctica clínica que implicava realitzar la determinació no invasiva del genotip RHD fetal a totes les gestants RhD negatives, en el marc del conjunt de proves que engloba la analítica rutinària de primer trimestre (**Annex 3**).

La implementació d'aquesta guia de pràctica clínica tenia per objectiu identificar el genotip RHD fetal en sang materna a les gestants RhD negatives per tal d'evitar l'administració innecessària de la gammaglobulina anti-D en els casos en què es determinés que el fetus era RhD negatiu.

Així doncs, en aquest estudi observacional retrospectiu, es van incloure totes les gestants RhD negatives controlades al nostre servei a les que es va realitzar l'analítica estandard de primer trimestre entre el dia 1 de Gener del 2013 i el dia 31 de Desembre del 2017.

Posteriorment, es va dur a terme una revisió del resultat de la determinació prenatal del genotip RHD fetal de les gestants i del fenotip RhD dels seus nadons respectius, a

través de la història clínica. També es va realitzar una revisió al seu historial sobre si havien patit o no algun esdeveniment immunitzant en el decurs de la gestació que hagués precisat l'administració de la gammaglobulina anti-D.

5.2. PROTOCOL D'ESTUDI

5.2.1. Variables registrades

Les variables registrades són les següents:

- **Genotip RHD fetal prenatal.** Els resultats poden ser positiu, negatiu o no conclouent.
- **Fenotip RhD del nounat.** Els resultats poden ser positiu o negatiu.
- **Existència d'esdeveniments tributaris d'administració de la profilaxis** amb gammaglobulina anti-D durant la gestació (amniocentesi, biòpsia corial, metrorràgia, versió externa, traumatisme abdominal, ...) i el seu nombre (en cas d'haver-hi més d'un).
- **Gestacions múltiples**
- **Presència d'alloanticossos eritrocitaris**
- **Presència d'alels RHD silencis en genotip matern**
- **Compliment de la pauta de profilaxis d'administració de gammaglobulina anti-D.**

5.2.2. Mostres

Mostra de sang perifèrica

Coincidint amb l'extracció rutinària de primer trimestre que es realitza a l'HSCSP entre les 8 i les 13+6sg s'obtenia una mostra de sang en un tub amb EDTA com a anticoagulant, per a la determinació del grup sanguini (ABO i RhD) i l'escrutini d'anticossos irregulars, com es fa habitualment per al control immunohematològic de les gestants.

Més del 80% de les mostres obtingudes corresponien a gestants amb una edat gestacional que es trobava entre les 9 i les 11sg.

Les mostres es van processar d'acord amb el protocols de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau i del Banc de Sang i Teixits (BST).

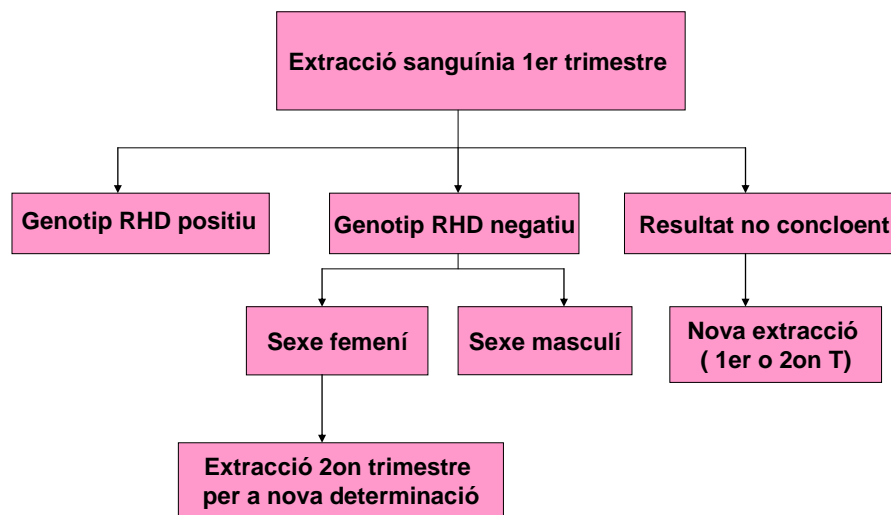


Figura 8. Circuit de mostres sanguínies per a la determinació del genotip RHD fetal.

Les mostres sanguínies de totes aquelles gestants amb un resultat de fenotip RhD negatiu, s'envien al Laboratori d'Immunohematologia del Banc de Sang i Teixits on es processen les mostres seguint el procediment normalitzat de treball (PNT) per a l'estudi del genotip RHD fetal a partir del plasma matern (**Figura 8**). Aquest procediment s'inicia amb l'extracció del DNA lliure circulant en el plasma (cfDNA) a partir d'un volum de 1 ml de plasma de les gestants, utilitzant l'extractor automàtic QIASymphony SP*.

**En el cas que el resultat del genotip RHD fetal fos negatiu en un fetus femení, es sollicitava l'enviament d'una nova mostra coincidint amb l'extracció rutinària del*

segon trimestre, per a confirmar el resultat del RhD fetal abans de la setmana 28.

Mostra del nounat

Després del naixement es cursa, segons protocol hospitalari, una mostra sanguínia en un tub EDTA del cordó umbilical del nounat, que es recull amb l'objectiu de determinar el seu grup sanguini (ABO) i el fenotip RhD (positiu o negatiu).

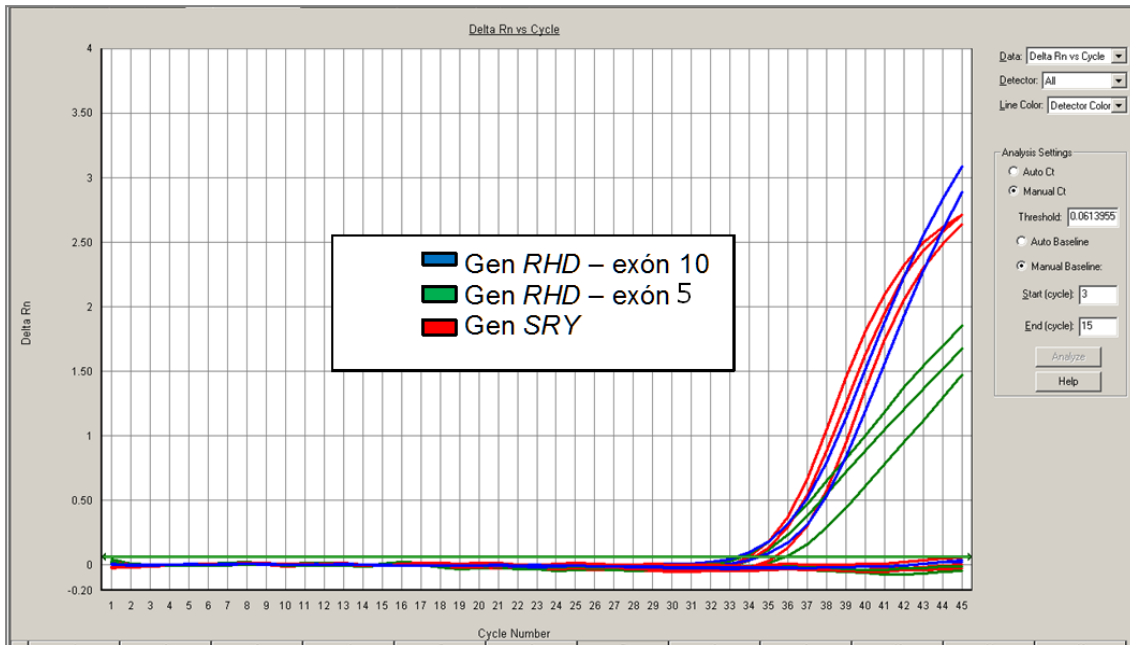
5.2.3. Mètode de determinació del genotip RHD fetal a partir del plasma matern

Per a determinar la presència del gen RHD fetal en el DNA lliure extret del plasma matern, es realitza una reacció de PCR a temps real amb sondes TaqMan fluorogèniques específiques per als exons 5 i 10 del gen RHD. La selecció d'aquestes dues regions no adjacents es deu a la necessitat de dissenyar una estratègia d'amplificació RHD-específica, evitant regions de seqüència homòloga amb el gen RHCE. L'exó 10 codifica per una regió transcrita no traduïda del gen RHD, en la que la seqüència difereix molt del gen RHCE, i per això s'utilitza sovint en estratègies de genotipificació RHD. Així mateix, l'anàlisi de l'exó 10 permet detectar la presència de gens híbrids, del tipus RHD-CE-D, associats a al·lels silencis o a variants de l'antigen D amb una expressió molt alterada. El disseny utilitzat per a l'amplificació de l'exó 5 correspon al publicat per Finning et al ¹⁹¹ i permet discriminar entre el gen RHD normal i el pseudogen RHD (associat a un fenotip RhD negatiu).

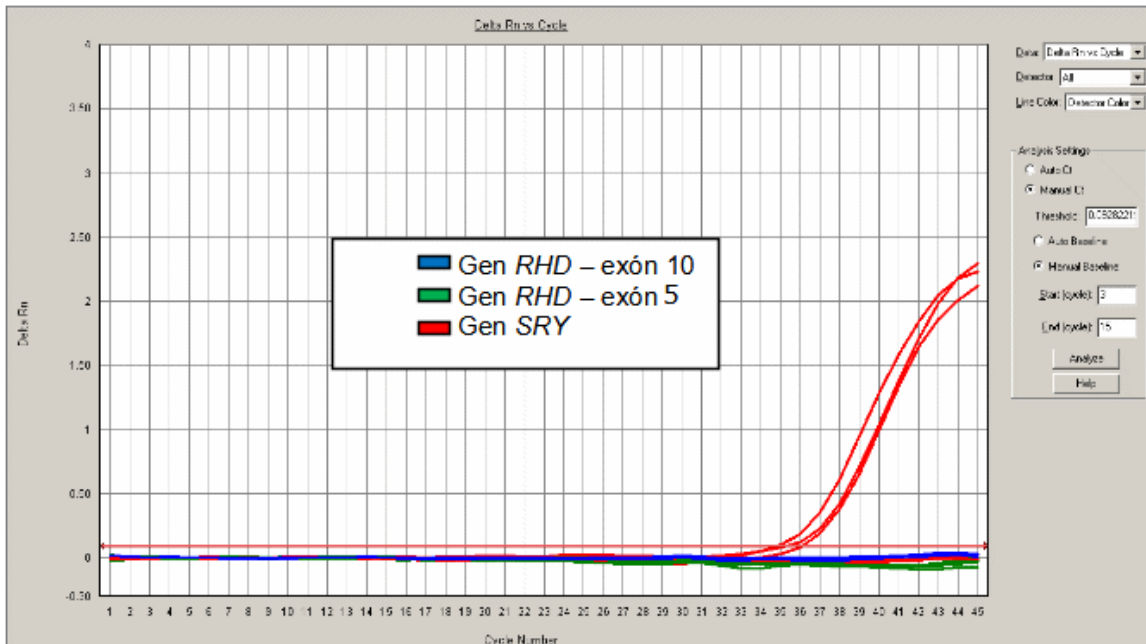
La prevalença del pseudogen RHD, en dones RhD negatives d'ascendència africana, fa que avui dia sigui necessària una estratègia de genotipificació RHD fetal capaç de discriminar entre aquests dos al·lels.

La determinació inclou també l'amplificació d'un fragment del gen SRY, un marcador del cromosoma Y ¹⁷⁶, que permet confirmar la presència de DNA fetal en aquells casos de fetus masculins RhD negatiu. En cas de resultats no concloents (per manca de reproducibilitat entre rèpliques de la mateixa reacció), o bé en aquells casos de fetus femení RhD negatiu, es sol·licita una segona mostra.

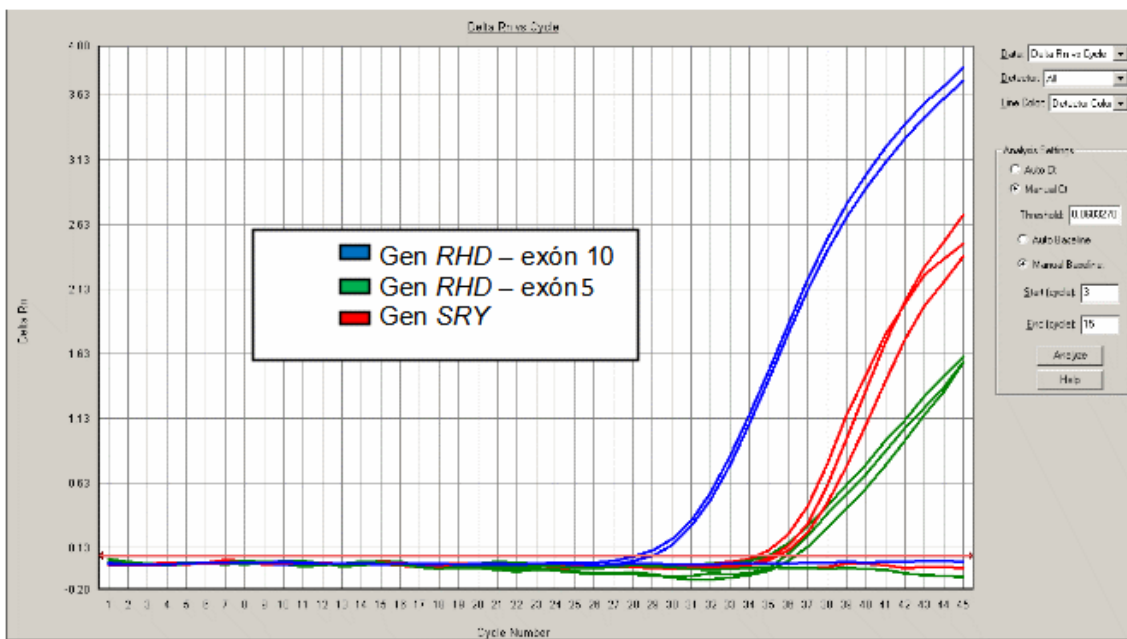
Veure **Annex 4** per a consultar el Procediment Normalitzat de Treball en relació a la determinació del genotip *RHD* fetal en plasma matern.



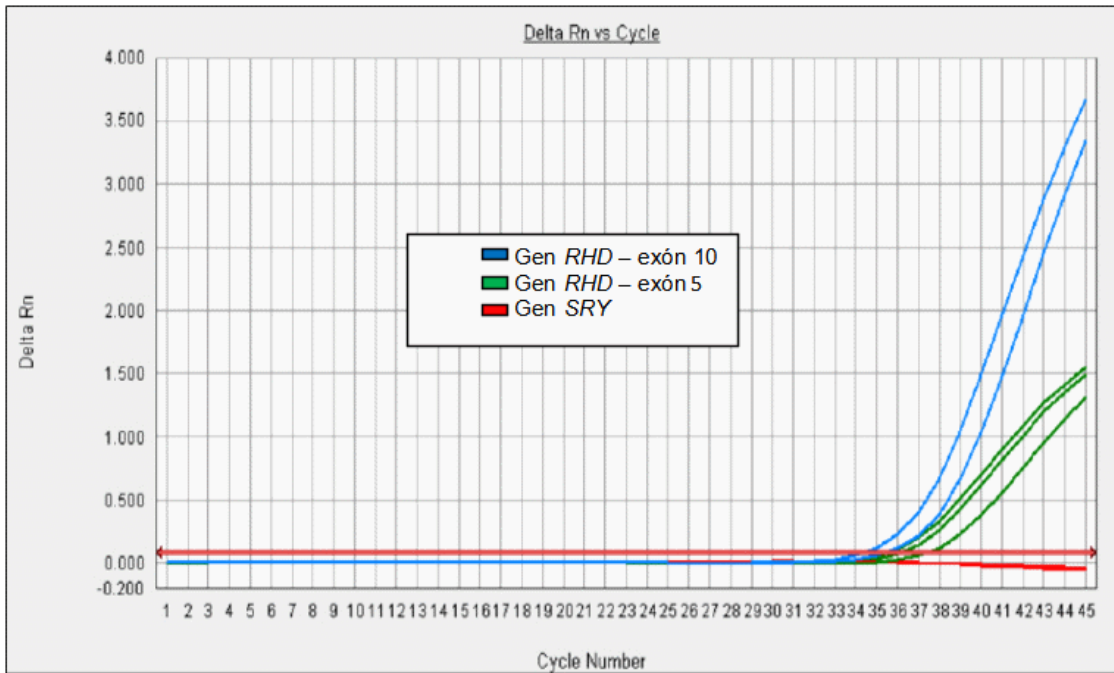
Fetus masculí RhD positiu



Fetus masculí RhD negatiu



Gestant portadora del Pseudogen RHD amb un fetus masculí RhD positiu



Fetus femení RhD positiu

5.3. ANÀLISI ESTADÍSTIC

Els resultats del genotipat RHD fetal en plasma matern es van comparar amb els del fenotip RhD del nounat determinat en una mostra de sang de cordó umbilical i es van calcular les taxes de concordança per als resultats positiu i negatiu tant a sang materna com a sang de cordó. Així mateix, es va detectar la sensibilitat, la especificitat i el valor predictiu positiu i negatiu de la tècnica.

Per a l'anàlisi estadístic s'ha utilitzat el software Epidat versió 3.1.

6. OBJECTIUS

6.1. OBJECTIU PRINCIPAL

Demostrar que la determinació del genotip RHD fetal no invasiu realitzada en el marc del control analític rutinari en el primer trimestre a les gestants RhD negatives és fiable, eficient i eficaç a la pràctica clínica diària.

6.2. OBJECTIUS SECUNDARIS

- Valorar si la implementació de la tècnica a la pràctica clínica diària és eficient en termes cost-benefici.
- Evaluar si és factible l'implementació de la determinació del genotip RHD fetal en sang materna a l'àmbit clínic diari durant el primer trimestre de la gestació coincidint amb l'analítica de rutina que realitzem a tota la nostra població de gestants.

7. RESULTATS

7.1. MOSTRES RECLUTADES

Es van reclutar, de forma consecutiva, totes les gestants classificades com RhD negatiu a l'estudi immunohematològic realitzat de rutina a la analítica standard de primer trimestre. En total van ser 532 gestants.

Del total de les 532 gestants RhD negatives 55 van ser assistides al part en altres centres i no es va poder disposar dels resultats del fenotip RhD del recent nascut, 3 van patir un avortament de primer trimestre, 6 van patir un avortament de segon trimestre, 2 van patir òbits fetals al tercer trimestre i 4 van sol.licitar una interrupció de la gestació per afectació fetal genètica o cromosòmica.

De totes les mostres analitzades 18 pertanyien a gestants de bessons. En tots els casos es va poder determinar el genotip RHD fetal prenatal i més endavant comentarem aquests casos en detall.

Finalment, vem poder analitzar la concordança en els resultats obtinguts en 462 casos.

7.2. RESULTATS GENOTIPATGE RHD FETAL

Del total de les 532 gestants RhD negatives reclutades al període de 2013 a 2017, 340 (63.90%) van presentar una determinació de genotip RHD fetal positiu i 192 (36.09%) negatiu.

Cinc mostres (0.94%) van resultar inicialment no concloents, però el genotip RHD fetal es va poder determinar satisfactòriament a la segona mostra en tots els casos (en 2 casos la mostra pertanyia encara a un primer trimestre i en 3 casos era una mostra de segon trimestre) (*Figura 9*).

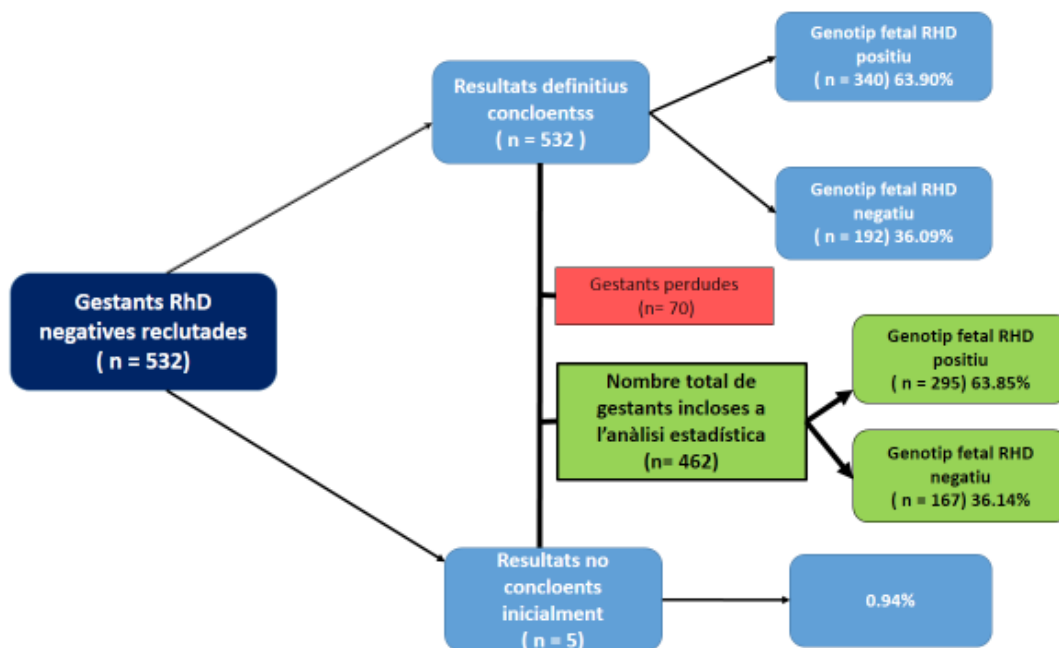


Figura 9. Resultats obtinguts en la genotipificació RHD durant el període 2013-2017.

En total, es van repetir 27 mostres que havien tingut un resultat inicial de genotipat RHD negatiu i sexe femení. No es van repetir tot el nombre de mostres que a priori s'haurien d'haver repetit (genotipat RHD negatiu sexe femení) perquè en ocasions el clínic desconeixia que s'havia de tornar a sol.licitar en el segon trimestre o bé perquè la gestant continuava controls a altres centres.

Finalment, totes les mostres repetides en el segon trimestre van presentar un resultat concordant amb la primera determinació.

Tanmateix, 6 de les gestants RhD negatives van ser identificades com a portadores d'un al.lel RHD silent. La nostra estratègia de genotipificació RHD fetal aplicada va permetre determinar el genotip RHD fetal amb èxit als 6 casos.

7.3. GRAU DE CONCORDANÇA ENTRE EL GENOTIP RHD FETAL I EL FENOTIP RhD DEL NOUAT

Com ja hem comentat, del total de les 532 gestants RhD negatives reclutades 340 (63.90%) van tenir una determinació de genotip RHD fetal positiu i 192 (36.09%) negatiu (**Figura 9**). Aquests resultats concorden amb la prevalença poblacional al nostre medi de persones RhD negatives.

✓ **Grup amb resultat del genotip RHD fetal positiu**

Del total de les 340 gestants amb determinació RHD positiu (**Figura 10**):

- 38 pacients van ser assistides al part a altres centres hospitalaris i no hem pogut disposar d'informació fiable sobre el fenotip RhD del recent nascut.
- 3 pacients van patir un avortament de segon trimestre
- 1 pacient va patir un òbit fetal a les 36sg (mort fetal d'un dels dos fetus d'una gestació monocorial-biamniòtica)
- 3 pacients van sol.licitar una interrupció de la gestació per afectacions genètiques/cromosòmiques del fetus.

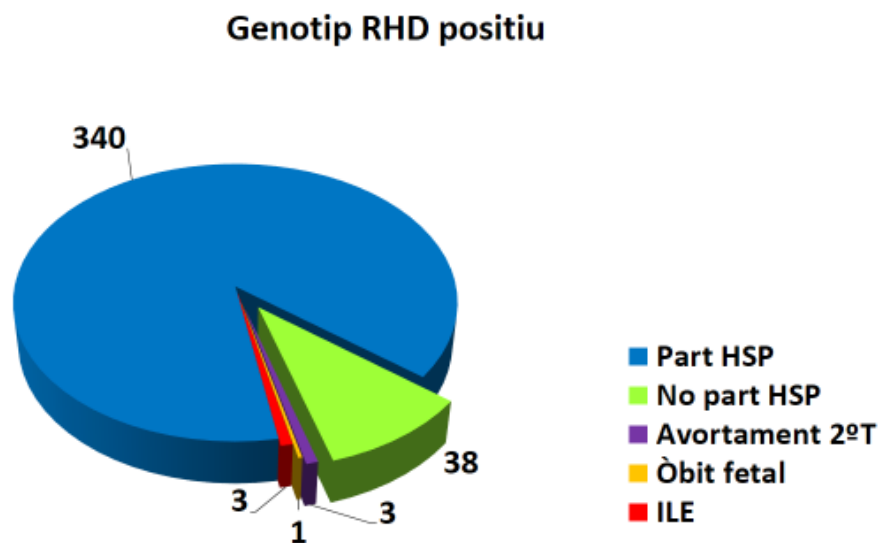


Figura 10. Gestants amb determinació genotip RHD fetal positiu.

Així doncs, disposem de la informació postnatal de 295 casos.

Del total d'aquests casos es van evidenciar dos discordàncies (0,677%) entre la determinació del genotip RHD fetal i el fenotip RhD del nouat:

- En un dels casos el fenotip RhD del nadó s'havia informat com a negatiu. Al detectar aquesta discordància es va revisar novament la mostra inicial del genotipatge RHD fetal i es va confirmar que l'estudi era clarament positiu. Posteriorment, es va dur a terme un estudi per a determinar el RhD a ambdós progenitors. La mare es va confirmar novament que tenia un fenotip RhD negatiu i el pare el tenia positiu. A més a més, es va dur a terme un estudi genètic d'ambdós pares que no evidenciava la presència de pseudogens ni de gens híbrids.

Així doncs, arribats aquest punt es va realitzar un estudi addicional al nadó (estudi d'ADN obtingut a partir d'una mostra de saliva) que va evidenciar que el seu genotip era RHD positiu.

Amb tota aquesta informació es va procedir a revisar el cas i es va concloure que l'explicació més plausible és la d'un possible error humà a l'hora de tramitar la mostra en el moment del postpart immediat. És a dir, es va excloure un error de la tècnica de genotipatge.

- En el segon cas el fenotip del nadó també s'havia informat com a RhD negatiu. Revisant el genotipatge RHD fetal vam evidenciar que s'havia informat que la mare era portadora d'un gen RHD silent. Així doncs, era un cas de fenotip RhD negatiu degut a que malgrat ser un recent nascut portador del gen RHD aquest no transcriu perquè és silent. Aquest cas entra dintre dels casos descrits a la literatura com a possibles "falsos positius" de la tècnica del genotipatge fetal. En qualsevol cas donat que la mare va rebre la immunoprofilaxis com si el seu fetus fora RhD positiu no va presentar cap risc d'isoimmunització de cara a futures gestacions.

Durant el control gestacional en 20 d'aquestes pacients es va precisar de la realització d'una tècnica invasiva amb indicació de completar l'estudi prenatal (15 biòpsies i 5 amniocentesi) i en tots els casos es va administrar una dosi de gammaglobulina anti-D després de la intervenció obstètrica.

En aquest grup 11 de les mostres analitzades pertanyien a gestacions de bessons. En 9 casos les gestacions eren bicorials biamniòtiques i en 2 casos monocorials biamniòtiques. En tots els casos es va detectar un genotip RhD fetal positiu que va ser concordant amb la determinació del fenotip postnatal.

Es van detectar 4 pacients amb isoimmunització anti-D prèvia a la gestació actual. En aquests casos la determinació del genotip RHD fetal en el primer trimestre ens va permetre planificar un control gestacional adequat i precoç amb l'objectiu d'evaluar el grau d'afectació fetal.

✓ **Grup amb resultat del genotip RHD fetal negatiu**

Del total de les 192 gestants amb determinació prenatal de genotip RHD fetal negatiu (**Figura 11**):

- 17 pacients van ser assistides al part a altres centres hospitalaris i no hem pogut disposar d'informació fiable sobre el fenotip RhD del recent nascut.
- 3 pacients van patir avortaments de primer trimestre
- 3 pacients van patir avortaments de segon trimestre
- 1 pacient va patir un òbit fetal a les 39sg
- 1 pacient va sol.licitar una interrupció de la gestació per una afectació genètica fetal (sd. Alagille).

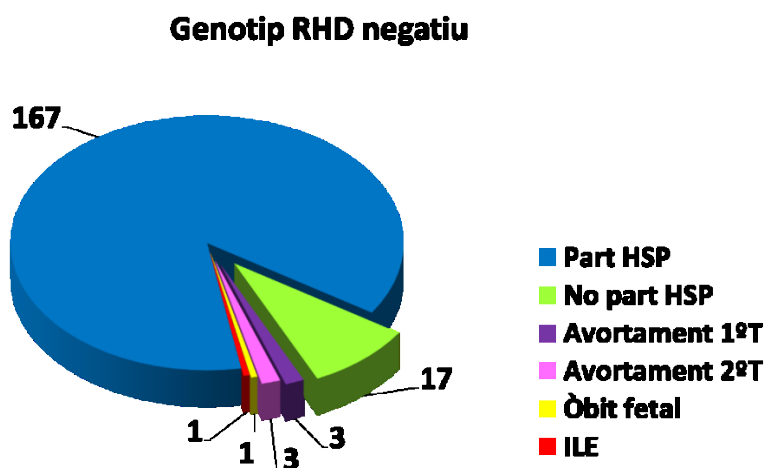


Figura 11. Gestants amb determinació genotip RHD negatiu.

Així doncs, disposem de la informació postnatal de 167 casos.

Del total d'aquests casos es va detectar una única discordància (0.59%) entre la determinació del genotip RHD fetal i el fenotip RhD del nadó. En aquest cas la determinació prenatal RHD va ser negativa i el fenotip RhD postnatal va ser positiu. Davant aquesta discordància es va fer una revisió exhaustiva de la mostra

prenatal i es va repetir la determinació amb una segona alíquota de la mostra conservada a -20°C. En aquesta ocasió el resultat del genotip RHD va ser positiu, concordant amb el fenotip del nadó, dada que posava de manifest un error durant el procesament de la primera mostra. Tenint en compte el procediment habitual l'opció més plausible és un incident en el procés d'etiquetatge de la mostra.

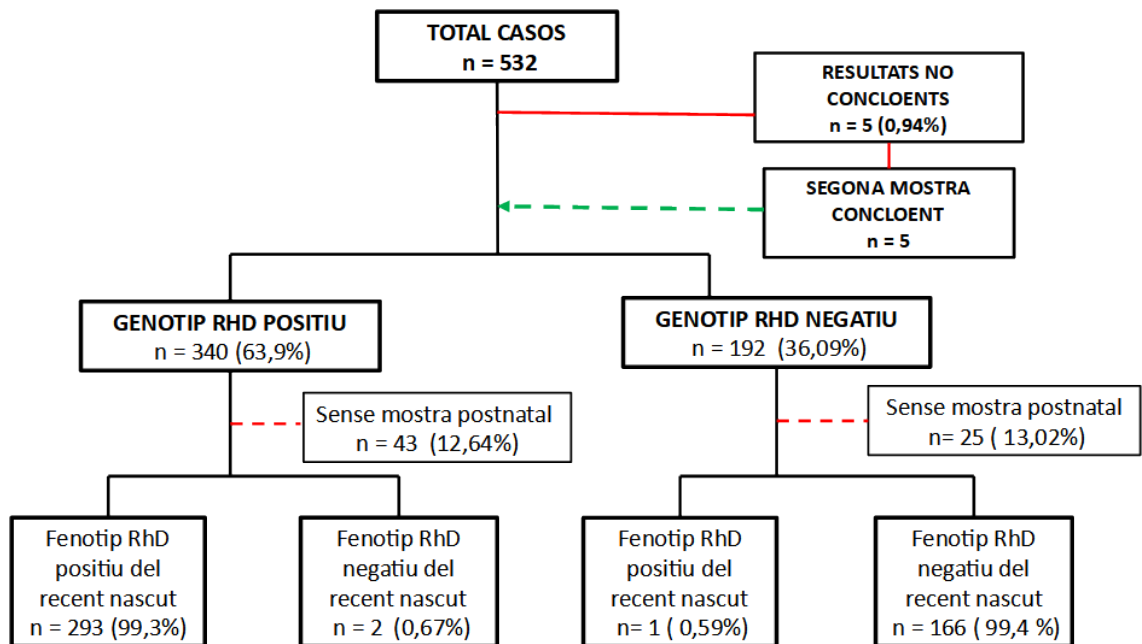


Figura 12. Resum dels resultats del genotipatge RHD fetal prenatal.

Dintre d'aquest grup, 7 pacients van precisar la realització d'una tècnica invasiva prenatal (5 biòpsies i 2 amniocentesi) i totes elles es van beneficiar de la determinació prenatal del genotip fetal ja que no van precisar l'administració de la gammaglobulina anti-D.

En aquest grup, 7 de les mostres analitzades pertanyien a gestacions de bessons. En 6 casos les gestacions eren bicorials biamniòtiques i en 1 cas monocorial biamniòtica. En tots els casos es va detectar un genotip RhD fetal negatiu que va ser concordant amb la determinació del fenotip postnatal.

Correlació entre el genotip del RhD fetal i fenotip dels recent nascuts

Fenotip recent nascut	Genotip fetal Exons 5 i 10		Total
	Positiu	Negatiu	
RhD positiu	293	1	294
RhD negatiu	2	166	168
TOTAL	295	167	462

Taula 4. Correlació entre genotip RHD i fenotip RhD

Es van detectar 4 pacients amb isoimmunització anti-D prèvia a la gestació actual. En aquests casos la determinació del genotip RHD fetal en el primer trimestre ens va permetre planificar un control gestacional adequat i tranquilitzar als pares donat que el seu fetus era RhD negatiu.

7.4. RESULTAT DE L'ANÀLISI ESTADÍSTIC

A continuació es presenta un anàlisi dels resultats obtinguts.

La **sensibilitat** de la determinació prenatal no invasiva del genotip RHD fetal durant el primer trimestre a la **pràctica clínica habitual** en el nostre cas és del 99,66 % (IC 95% 98,82-100) i la **especificitat** és del 98,81% (IC 95% 96,87-100) (**Taula 5**).

DETERMINACIÓ PRENATAL RHD (PRÀCTICA CLÍNICA)	VALOR (%)	IC 95% (%)
Sensibilitat	99.66	98.82-100
Especificitat	98.81	96.87-100
Valor predictiu positiu	99.32	98.22-100
Valor predictiu negatiu	99.40	97.93-100

IC % (95%): interval de confiança del 95%.

Taula 5. Sensibilitat i especificitat del genotipatge fetal RHD a la pràctica clínica.

La taxa de falsos positius en el nostre cas ha estat de 1.19% i la taxa de falsos negatius del 0.34%. En el cas de la determinació prenatal del genotip RHD fetal és molt important tenir en compte la taxa de falsos negatius perquè implica no administrar gammaglobulina anti-D a una gestant RhD negativa portadora de un fetus RhD positiu i això pot provocar que desenvolupi una MHFN en següents gestacions si el fetus és RhD positiu com a resultat d'una isoimmunització produïda en el transcurs d'aquesta gestació.

7.5. ADMINISTRACIÓ DIRIGIDA DE LA GAMMAGLOBULINA ANTI-D

Com ja hem comentat, la determinació del genotip RHD fetal ens va permetre realitzar una administració de la gammaglobulina dirigida i selectiva a la nostra població de gestants (**Figura 13**).

De manera que només se'ls hi va administrar a aquelles gestants amb una determinació de genotip RHD fetal positiva. La seva pauta d'administració va ser l'habitual: a les 28sg, després del part i davant de l'aparició de qualsevol esdeveniment immunitzant (realització de tècniques invasives, metrorràgies, versions externes, traumatismes abdominals,...).

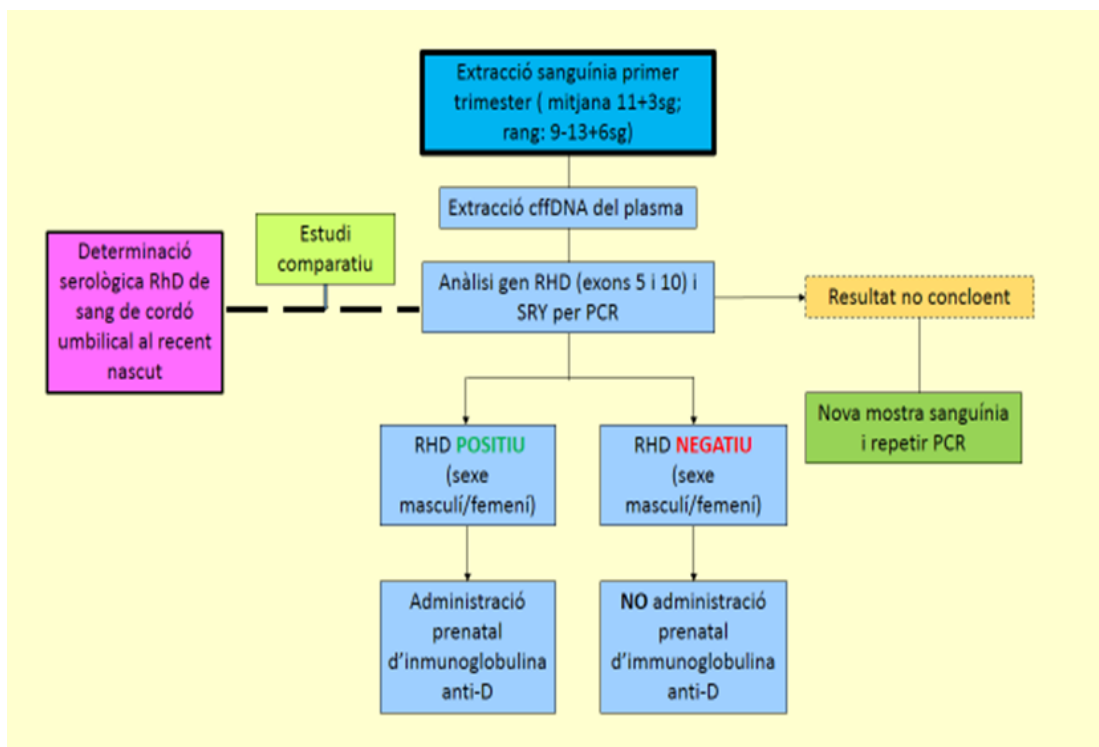


Figura 13. Diagrama de criteris d'administració de la gammaglobulina anti-D.

Evidentment, a les gestants amb determinació RHD fetal negativa no se'ls hi va administrar.

Així doncs, a la nostra sèrie vem aconseguir evitar l'administració innecessària de 206 dosi de gammaglobulina anti-D (192 gestants a les que no es va administrar a les 28sg, 7 dosis més que pertanyen a les que no es van administrar després de realitzar tècniques invasives i 7 més que no es van administrar després de pèrdues gestacionals).

Aquest fet no únicament és important per la implicació d'estalvi econòmic sino que el fet de no administrar un derivat biològic a una dona que realment no el necessita és un hàbit de bona praxi mèdica. Cal recordar també que l'obtenció de gammaglobulina anti-D es realitza a partir de productes biològics obtinguts d'humans i, per lo tant, és un material escàs i la seva indicació s'hauria de gestionar seguint un principi de racionalitat.

A més a més, a dia d'avui al nostre centre continuem realitzant la determinació del fenotip RhD en sang de cordó a tots els recent nascuts i en funció del resultat es valora la indicació d'administrar la gammaglobulina anti-D o no en el postpart. Aquest punt té

rellevància degut a que ens permet detectar el cas hipotètic del fals negatiu i administrar la gammaglobulina en el postpart. Aquesta intervenció disminuiria el risc d'isoimmunització a la gestant i les complicacions obstètriques que podrien derivar-se en futures gestacions.

7.6. ANÀLISI COST-BENEFICI DE LA IMMUNOPROFILAXI DIRIGIDA PER LA DETERMINACIÓ PRENATAL DEL GENOTIP RHD FETAL VERSUS EL MODEL ACTUAL

A continuació es presenta un anàlisi del cost de la determinació del genotip RHD fetal prenatal i la comparativa amb el cost del protocol d'actuació habitual davant les gestants RhD negatives no isoimmunitzades.

Per això, és necessari conèixer el preu de mercat de la gammaglobulina anti-D que en aquests moments és de 61.19€ així com el cost de realitzar el test de determinació del genotip RHD prenatal que, en el nostre cas, el cost estimat (aportat pel BST) és de 49€ per mostra.

- **Administració dirigida de la gammaglobulina anti-D segons resultat de genotipatge RHD fetal**

En primer lloc calcularem la despesa del genotipatge RHD fetal. En total es van fer 537 determinacions (532 mostres inicials i 5 més que no van tenir un resultat concloent i es van haver de repetir). Donat que el seu preu és de 49 euros la despesa total és de 26.313 euros (537 mostres x 49 euros).

A més a més, hem de tenir en compte que a totes les gestants amb una determinació del genotipatge RHD fetal positiu se'ls hi va administrar la gammaglobulina anti-D a les 28sg i després de realitzar una tècnica invasiva o davant fenòmens immunitzants. En total van ser 340 gestants amb determinació RHD fetal positiva. En aquest grup es van realitzar tècniques invasives a 20 pacients. Així doncs, el cost de totes aquestes dosis és de 22.028,4 euros (360 x 61.19 euros).

El **cost total** d'aquesta estratègia seria de **48.341,4 euros** i de 90,86 euros per pacient.

- 26.313 euros (cost genotipatge)
- 22.028,4 euros (cost gammaglobulines anti-D)

- **Administració universal de gammaglobulina anti-D**

En aquest cas hauríem de comptabilitzar el cost del total de dosi de gammablogulina anti-D que s'administrarien en aquesta població.

En total són 532 gestants, així doncs, hauríem d'incloure 532 gammaglobulines (la majoria s'administrarien a les 28sg excepte les que s'administrarien després d'un avortament) i a aquestes afegir les que s'administrarien després de tècniques invasives que són 27 (total 27 tècniques invasives).

El **cost total** d'aquesta estratègia seria de **34.205,21euros** (559 dosi x 61.19 euros) i de 64,29 euros per pacient.

Així doncs, el cost econòmic de l'estratègia d'administració universal de gammaglobulina anti-D és inferior al cost de l'estratègia d'administració dirigida ja que implicaria un increment de 26.57 euros per pacient.

No obstant, si tenim en compte el principi de beneficiència del pacient i que s'està estalviant l'administració d'un producte biològic d'origen humà a una pacient jove que no ho necessita fora adequat pensar que el cost addicional que té l'implementació universal del genotipat RHD fetal estaria totalment justificat.

8. DISCUSSIÓ

8.1. PRINCIPALS TROBALLES D'INTERÈS

En el nostre grup de gestants RhD negatives hem trobat una incidència de dones portadores de fetus RhD negatius de gairebé el 40% (36.09%) tal i com es descriu a la literatura.

Les principals troballes del present estudi van ser les següents:

1. La concordança entre la determinació del genotip RHD fetal realitzada al primer trimestre i el fenotip a sang de cordó del nounat va ser del 99.32%.
2. El nostre estudi reflexa els resultats obtinguts en una sèrie amb una "n" considerable en població espanyola amb determinació RHD fetal realitzada exclusivament durant el primer trimestre de gestació.
3. La sensibilitat obtinguda va ser del 99.66% (IC 95% (98.82-100)) i la especificitat del 98.81% (IC 95% (96.87-100)).
4. La nostra taxa de falsos negatius (0.34%) es troba al límit baix de la taxa de falsos negatius publicada a la resta d'estudis que presenten la seva experiència en la determinació del genotip RHD fetal en el primer trimestre.
5. La revisió dels nostres resultats evidencia que dos de les tres discordances que vem detectar entre la determinació prenatal i postnatal al dur a terme la implementació de la tècnica a la pràctica clínica diària assistencial són en gran part degut a la manipulació de les mostres i no pas a la fiabilitat de la tècnica de determinació prenatal del genotipat RHD fetal. Així doncs, si valoressim la sensibilitat i la especificitat de la tècnica de forma aïllada obtindríem uns resultats inmillorables ja que la sensibilitat seria del 100% i l'especificitat del 99.40% (**Taula 6**).

DETERMINACIÓ PRENATAL RhD (TECNIQUES)	VALOR (n)	IC 95% (n)
Genotipatge	1000	36,09-36,09
Genotipatge + genotipatge fetal	1000	36,09-36,09
Genotipatge + genotipatge fetal + genotipatge fetal	1000	36,09-36,09
Genotipatge + genotipatge fetal + genotipatge fetal + genotipatge fetal	1000	36,09-36,09

IC 95% (n): interval de confiança del 95%.

Taula 6. Sensibilitat i especificitat teòrica del genotipatge fetal RHD.

A més a més, l'altre resultat discordant forma part d'una possibilitat ja contemplada amb la tècnica i que està derivada de l'existència de gens silencis a la població general.

6. L'aplicació de la nostra guia de pràctica clínica de forma universal permet realitzar una estratègia d'immunoprofilaxis selectiva basada en el genotipatge RHD prenatal que podria provocar l'administració innecessària en alguns casos de la gammaglobulina anti-D (1,19% taxa de falsos positius a la nostra sèrie) però evitaria l'administració innecessària al 36,09% de mares RhD negatives no isoimmunitzades evitant així els riscos de l'exposició a un material biològic aliè.

7. El fet de conèixer el genotip RHD fetal a l'inici de la gestació permet realitzar una immunoprofilaxis selectiva i dirigida de la gammaglobulina anti-D en els casos d'avortaments tardans de primer trimestre i davant la realització de tècniques invasives (amniocentesi, biòpsies corials, ...) que es duen a terme durant el primer trimestre.
8. La nostra aproximació al cost/benefici d'aquesta tècnica indica que és possible la seva implementació sense que això incrementi de manera considerable el cost del programa preventiu. De fet, aquesta estratègia d'immunoprofilaxis selectiva és un 29,25% més cara (26,57 euros per pacient) que l'actual estratègia d'immunoprofilaxi.

8.2. RELACIÓ DELS NOSTRES RESULTATS AMB ELS OBTINGUTS A ESTUDIS PREVIS

Existeixen diverses tècniques de laboratori per a dur a terme la determinació del genotip RHD fetal no invasiu que es diferencien bàsicament en els exons que es fan servir per analitzar el gen RHD.

En els estudis publicats, fins ara, s'han fet servir diferents exons o combinacions d'ells com a diana en l'anàlisi per PCR per a la determinació prenatal del genotip RHD fetal. El programa "Special Non-Invasive Advances in Fetal and Neonatal Evaluation Network of excellence" va defensar la combinació dels exons 5 i 7 per a discriminar la presència del pseudogen RHD ψ , molt freqüent a individus d'origen africà ^{180,190,192-195}. En el nostre cas, el laboratori del Banc de Sang va optar per la combinació dels exons 5 i 10 per a realitzar una bona discriminació del pseudogen RHD.

Alguns estudis ¹⁹⁶⁻¹⁹⁷ han descrit assajos múltiples amb diferents combinacions d'exons 4, 5, 7 i 10. Malgrat que la utilització simultània de diversos exons permet un augment en la sensibilitat de la tècnica també ha demostrat augmentar el nombre de resultats no concloents, al complicar la interpretació dels resultats, augmentant la necessitat de reanàlisi ¹⁹⁸.

Finning et al ³⁹ mitjançant la detecció dels exons 5 i 7 van obtenir un 0.2% de falsos negatius, un 0.8% de falsos positius i un 3.4% de resultats no concloents en 1869 mostres obtingudes amb una mitjana d'edat gestacional de 28 setmanes.

A un altre estudi realitzat amb 1022 gestants, Müller et al ⁴⁰ també descriuen un 0.2% de falsos negatius fent servir un sistema d'extracció manual d'ADN i un 0.1% de falsos negatius amb un

sistema automatitzat, a una edat gestacional mitjana de 25 setmanes. Els falsos positius van ser del 0.3% i del 0.7%, respectivament, per als dos mètodes d'extracció. Tanmateix, Van der Schoot et al ¹⁷⁶, en 1257 mostres obtingudes al voltant de les 30 setmanes, van obtenir un 0.2% de falsos negatius i un 0.4% de falsos positius. A Espanya, Macher et al ¹⁹⁹, van estudiar 1012 gestants de entre 10 i 28 setmanes mitjançant l'ús dels exons 5 i 7 i SRY i van trobar una taxa de falsos negatius i falsos positius de 0 i 1.1% respectivament.

Wikman et al ²⁰⁰, en un estudi ampli amb una població de 4118 gestants analitzant únicament l'exon 4 informen d'un 5.1% i un 4% de reanàlisi i resultats no concloents, respectivament i assenyalen que aquestes xifres poden ser degudes en el seu cas a un temps excessiu en el transport i emmagatzemament de les mostres fins al seu procesament. En el nostre cas, les mostres es van transportar immediatament i van ser processades en les primeres hores després de l'extracció. No obstant, aquest és un punt important a tenir en compte en el cas de la implantació universal a la pràctica clínica habitual ja que les mostres poden tenir el seu origen a diferents punts de localització amb una distància molt variable respecte al laboratori al que es duu a terme el seu anàlisi i s'hauria d'establir rigurosament el circuit de transport.

Per una altra banda, l'emmagatzematge de les mostres de sang a temperatura ambient pot ocasionar la destrucció d'ADN fetal a la mostra, qüestió especialment important a les primeres setmanes de l'embaràs ²⁰¹, quan la quantitat de cffDNA pot ser baixa, el que podria provocar un augment del nombre de falsos negatius ^{202,203} tal i com ja hem comentat amb anterioritat.

Aquest darrer punt ens porta a recordar que un aspecte força rellevant del nostre estudi radica en que la determinació del genotip RHD fetal s'ha dut a terme exclusivament durant el primer trimestre de la gestació.

En diverses ocasions, s'ha argumentat en contra de la determinació del genotip a edats gestacionals tempranes perquè la concentració del cffDNA al plasma matern és menor que a les etapes més avançades de la gestació i aquest fet provoca un increment en la taxa de falsos negatius ²⁰⁴ així com un augment del nombre de resultats no concloents. És per aquest motiu que és de vital importància la utilització a l'assaig d'un marcador fetal universal que avaluï la presència d'ADN fetal (en el nostre cas va ser SRY). A destacar que a la nostra sèrie la taxa de falsos negatius va ser baixa (0,34%) malgrat la mostra s'obtenia entre les 8 i les 13+6sg (més del 90% de les mostres es van obtenir entre les 9 i les 11sg donat que l'extracció coincidia amb la realitzada per al cribatge d'aneuploidies), . De fet, inicialment a aquelles gestants a les que es determinava un genotipatge de

fetus RHD negatiu de sexe femení se'ls hi tornava a realitzar una determinació per al genotipatge en el segon trimestre (donat que la concentració del cffDNA era més elevada). No obstant, es va realitzar durant un període molt curt del temps donat l'elevada concordança entre les dues mostres.

En una revisió publicada al 2017 per van der Schoot ¹⁹⁴ a la que es fa un recull de diversos estudis de genotipatge RHD fetal realitzats en primer i segon trimestre de gestació a gran escala han informat d'una sensibilitat que va desde el 96.15% fins al 99.81% per a mostres recollides durant el primer trimestre. L'especificitat observada ha oscil.lat entre 95.49% i 99,70% en aquests casos. Així doncs, els nostres resultats es troben en la línia dels resultats publicats (sensibilitat 99,66% i especificitat 98,81%) ²⁰⁵ . De fet la sensibilitat que vem obtenir a la nostra sèries és molt similar a la que té la determinació del fenotip a sang de cordó (99.5%) ¹⁹⁰ .

La especificitat obtinguda (98.81%, IC 95% (96.87-100)) també és similar a la publicada per altres autors i molt semblant a la que presenta la determinació RhD a sang de cordó (99,7%) ¹⁹⁰ , ja que en el 0.2-1% dels casos la serologia pot no identificar un nounat RhD positiu correctament classificat amb el genotipat. Això és degut a la presència de variants del gen RHD amb expressió fenotípica feble ¹⁹⁹ . El fet d'assignar falsament un fenotip RhD positiu a un fetus RhD negatiu té una importància clínica menor, ja que el maneig de la gestació es farà de la mateixa forma que si no es realitzés el test, és a dir, amb l'administració innecessària de gammaglobulina anti-D. No obstant, les variants RHD amb expressió feble han demostrat ésser potencials causants d'isoimmunització anti-D ¹⁹⁹ i el genotipat a sang materna podria evitar aquests casos ²⁰⁰ .

La taxa de falsos negatius evidenciada als darrers estudis realitzats amb mostres de plasma durant primer trimestre es troba entre el 1% i el 3.5% ^{195,200,206} . De fet Akolekar et al ¹⁹³ en un estudi realitzat a 591 gestants que es trobaven en el primer trimestre de gestació van trobar un 3.5% de falsos negatius i un 14.3% de resultats no concloents. A destacar que a la nostra sèrie la taxa de falsos negatius va ser del 0,34% (bastant inferior a la del estudis mencionats) i únicament vem tenir un 0,94% (també molt inferior al reportat en aquests estudis) de resultats inicialment no concloents (n=5) que en tots els casos es van poder genotipar correctament amb una segona mostra sanguínia.

En resum, podem concloure que els nostres resultats demostren una alta fiabilitat de la tècnica de genotipat prenatal quan es duu a terme al primer trimestre de la gestació.

Si revisem detingudament la nostra taxa de falsos negatius (0.34%) podrem comprovar que només vem tenir un cas. No obstant, cal recordar que aquest tipus d'error a la determinació fa que la gestant presenti un increment del 0.7% en el risc d'isoimmunització ^{19,91} donat que no se li ha administrat la gammaglobulina anti-D. No obstant, en el nostre cas aquest percentatge es redueix donat que al naixement es fa sempre la determinació del grup i RhD en sang de cordó umbilical i l'administració postnatal de la gammaglobulina anti-D es fa en funció d'aquest resultat. De fet, en aquest cas es va determinar que el recent nascut era RhD positiu i va ser possible l'administració postpart de la gammaglobulina. A més a més, vem fer un seguiment d'aquesta gestant i en la seva segona gestació va presentar un escrutini d'anticossos irregulars negatiu a tots els trimestres. Així doncs, podem estar segurs que no va patir una isoimmunització.

Hem de fer especial èmfasi en que al genotipatge RHD fetal allò que realment volem evitar són els casos de falsos negatius donat que impliquen un increment en el risc d'isoimmunització de la gestant. Tanmateix, en el cas dels falsos positius únicament administrarem de forma innecessària la gammaglobulina però en cap cas augmentarem a la gestant el risc d'isoimmunització ni de MHFN en futures gestacions.

Un valor afegit derivat de la determinació durant el primer trimestre és que el fet de conèixer el genotip RHD a l'inici de la gestació permet realitzar una immunoprofilaxis selectiva de la gammaglobulina anti-D en els casos d'avortaments, davant la realització de tècniques invasives (amniocentesis, biòpsies corials, cordocentesi,...), en casos de pèrdues gestacionals tardanes i davant de l'aparició de qualsevol esdeveniment al·loimmunitzant (traumatismes, metrorràgies, versions externes,...). Quan el genotipatge es realitza al segon/tercer trimestre i es determina que el fetus és RHD negatiu la gestant ja no pot beneficiar-se de la immunoprofilaxis selectiva davant d'aquests esdeveniments ²⁰⁰ que, per una altra banda, no són infreqüents.

Un altre benefici de la determinació del genotip prenatal realitzat durant el primer trimestre és que permet programar precoçment el tipus de control que haurem de realitzar si la gestant té un diagnòstic d'isoimmunització. En aquest punt també m'agradaria comentar que el fet de tenir informació de forma precoç sobre si el fetus de la parella tindrà risc d'anèmia fetal o no permet disminuir molt l'angoixa dels pares en el cas que el genotipatge sigui negatiu i anticipar-nos a programar els controls obstètrics més exhaustius en el cas de genotipatge fetal positiu.

També ens agradaria esmentar que la revisió dels nostres resultats evidencia que dos de les discordàncies que vem detectar

entre la determinació prenatal i postnatal al dur a terme la implementació de la tècnica a la pràctica clínica diària assistencial són degudes a un error humà i no a la fiabilitat de la tècnica de determinació prenatal del genotipat RHD fetal. En aquest punt voldríem fer especial èmfasi a la importància de l'automatització dels processos al laboratori donat que poden disminuir la taxa de falsos positius i negatius així com recordar la importància en la recollida de les mostres i la seva correcta identificació que també pot disminuir aquesta taxa. Així doncs, si valoressim la sensibilitat i la especificitat de la tècnica de laboratori de forma aïllada obtindríem uns resultats encara millor que serien d'un 100% per a la sensibilitat i d'un 99.40% per a l'especificitat.

Tanmateix, els resultats discordants poden tenir altres causes. Els casos dels recent nascuts amb fenotip RhD negatiu i determinació prenatal positiva (falsos positius) poden tenir el seu origen a:

- la presència al recent nascut d'algun al·lel silent hereditat del pare o de la mare que faci que aquest gen no s'expressi i, per lo tant, presenti un fenotip negatiu (aquest és un dels nostres casos de fals positiu).
- la presència d'un fenotip RhD dèbil al recent nascut i, per lo tant, ser un resultat fals negatiu del fenotipat.

Ambdues circumstàncies estan descrites i s'han detectat amb anterioritat en estudis amb un elevat nombre de mostres ¹⁹⁶⁻¹⁹⁸.

Recentment, també s'ha descrit com a causa de falsos positius de la tècnica del genotipat RHD fetal la presència de quimerismes confinats a la placenta ²⁰²⁻²⁰³.

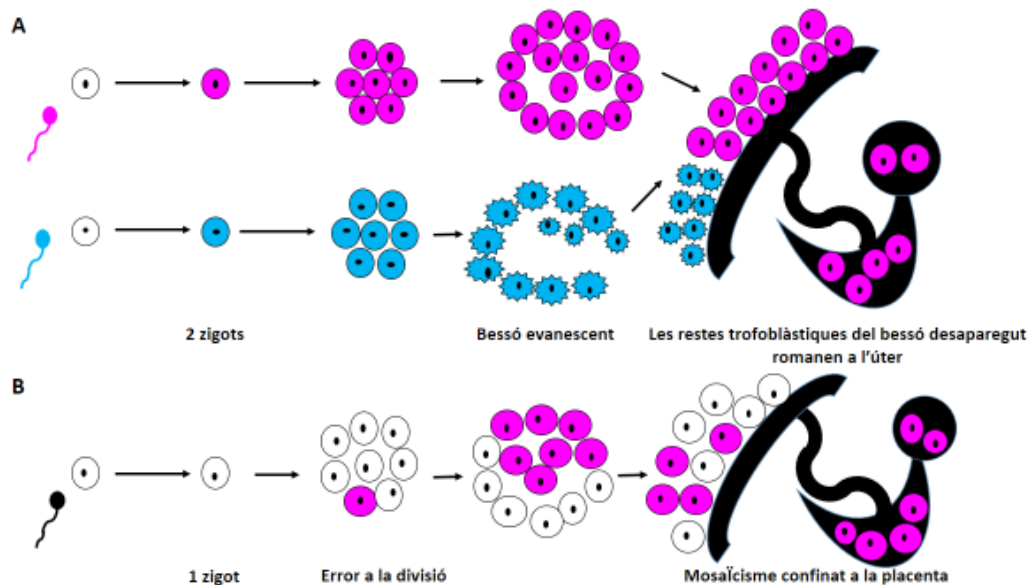


Figura 14. Quimerismes confinats a la placenta. **A.** Bessó evanescent. **B.** Mosaïcisme confinat a la placenta.

L'origen seria la presència d'un bessó evanescent (gestació de bessons inicial) o la presència de mosaïcismes confinats a la placenta (*Figura 14*).

8.3. ANÀLISI COST-BENEFICI DE L'IMPLEMENTACIÓ DEL PROGRAMA DE GENOTIPATGE RHD FETAL

Com ja hem comentat, la nostra aproximació al cost/benefici d'aquesta tècnica indica que és possible la seva implementació a la pràctica clínica habitual sense que això incrementi de manera excessiva el cost del programa preventiu. De fet, si es realitzés una implementació universal del genotipat RHD prenatal durant el primer trimestre el cost addicional total de la tècnica seria de 14.136,19 euros (29,25%) que implicaria un increment per pacient de 26,57 euros respecte al cost actual.

No obstant, estem convençuts que aquest cost addicional quedaria absolutament justificat pel fet que ens permetria realitzar una immunoprofilaxis dirigida administrant la gammaglobulina anti-D únicament a les gestants RhD negatives que ho tenen indicat ^{199,207-210} (en el nostre cas es va evitar l'administració d'un

bioderivat a 206 dones amb el que això implica desde el punt de vista de la pacient (no haver-se de sotmetre's a possibles efectes adversos ja sigui immunològics o infecciosos derivats d'un producte humanoide)).

Un altre punt a tenir en compte és que si es comença a implementar de forma universal el genotipatge RHD fetal i les taxes de falsos negatius obtingudes són baixes arribaria un punt en el que podríem plantejar-nos deixar de realitzar el fenotipatge en sang de cordó umbilical. Aquest esdeveniment faria reduir costos derivats del propi anàlisi i de l'obtenció i tramitació de les mostres. De totes formes, aquest és un escenari que actualment queda llunyà degut al reduït nombre de centres al que s'ha implantat el genotipat al nostre territori.

La guia NICE ²⁰¹ l'any 2016 va concloure que les despeses totals per fer servir el NIPT ("non invasive prenatal test") per determinar el genotip RHD fetal amb l'objectiu de realitzar una immunoprofilaxis prenatal anti-D guiada no són substancialment diferents de les despeses totals de la pràctica actual ²¹⁰, oferint profilaxis prenatal anti-D a totes les gestants RhD negatives, sempre i quan no hi hagi canvis al protocol actual de determinació del fenotip RhD del recent nascut. És a dir, que es continui realitzant la determinació del fenotip en sang de cordó umbilical del recent nascut tal i com es venia fent fins ara.

També va recomanar la determinació del genotip prenatal donat que permet reduir l'ús innecessari de gammaglobulina anti-D ^{209,211} i aquesta reducció podria afectar a un gran nombre de gestants.

A més a més, en gestants isoimmunitzades disposar de la determinació del genotip RHD fetal al primer trimestre de forma rutinària permetria també reduir les despeses associades a les visites a Unitats d'Alt risc i Medicina Fetal i a determinacions serològiques seriades si determinem que la gestant és portadora d'un fetus RHD negatiu.

En resum, els resultats presentats demostren que els fetus de les gestants RhD negatives poden ser genotipats a l'inici de la gestació amb una elevada fiabilitat, el que ens aboca a afirmar que probablement estem en condicions d'acceptar la determinació del genotip RHD fetal prenatal no invasiu com a un test segur i fiable per a dur a terme la seva implementació a la pràctica clínica habitual i oferir-lo a les gestants durant el primer trimestre de la gestació de forma universal.

8.4. LIMITACIONS DE L'ESTUDI

Malgrat que la nostra sèrie presenta un nombre elevat de gestants (n=462) a les que s'ha realitzat la determinació del genotip RHD fetal durant el primer trimestre al nostre país és necessari continuar ampliant l'estudi per a evaluar els resultats a més llarg plaç.

Els resultats que hem obtingut són aplicables a una població amb les característiques ètniques similars a les nostres. S'ha de tenir present que aquests mateixos resultats no es podrien extrapolar a poblacions amb diferents percentatges de determinades ètnies com seria major freqüència d'ètnia africana (major presència de pseudogen RHD Ψ i al·lel híbrid RHD-CE-Ds) o asiàtica (menor incidència poblacional de fenotip D negatiu).

9. CONCLUSIONS

- El treball realitzat demostra la bondat de la hipòtesi formulada i prova que la determinació del genotip RHD fetal a plasma matern realitzada durant el primer trimestre de la gestació es pot aplicar de manera universal a la nostra població.
- El treball realitzat demostra que la determinació del genotip RHD fetal a plasma matern realitzada durant el primer trimestre de la gestació és altament sensible, exacta i precisa.
- La nostra experiència d'incorporació del genotip RHD fetal a la pràctica clínica habitual en el maneig de les gestants RhD negatives a Catalunya ens ha servit per a demostrar que és fiable, sostenible y aplicable i que, per lo tant, estaria justificada la seva aplicació a la nostra població com a programa de cribatge RHD fetal prenatal. De fet, els resultats obtinguts recolzarien l'implementació del programa a altres centres del sistema públic català.
- Probablement, en un futur no molt llunyà la determinació del genotip RHD fetal prenatal pugui substituir a l'actual immunoprofilaxis i permeti realitzar una administració selectiva i dirigida de la gammaglobulina anti-D únicament a aquelles gestants portadores de fetus RHD positius estalviant així a la resta (aproximadament el 40% de les gestants RhD negatives) no només el cost econòmic de la seva administració sino també el risc biològic de la mateixa.
- Si es realitza la implementació del genotipatge RHD fetal de forma universal s'ha de realitzar un gran esforç per a reduir al màxim la taxa de falsos negatius (especial rellevància en recollida i identificació de la mostra per part del personal, màxima automatització al laboratori,...).
- La nostra aproximació al cost/benefici d'aquesta tècnica indica que seria factible la seva implementació a la pràctica clínica amb un increment total del cost d'un 29,25%, respecte a l'actual, en gestants no isoimmunitzades. No obstant, creiem que aquest increment del cost seria asumible en el marc estratègic actual de principi de beneficiència envers la pacient i tenint en compte que l'obtenció de la gammaglobulina anti-D té uns costos biològics i és un producte d'obtenció limitada.
- La determinació del genotip RHD fetal en el primer trimestre, en el cas de gestants isoimmunitzades, estalviarà costos econòmics i emocionals en el cas que la determinació fetal sigui negativa ja que evitarà controls innecessaris a unitats d'alt risc obstètric.
- Per últim, un altre punt a mencionar és que actualment es contempla la realització del test prenatal no invasiu per a la detecció de trisomia 13,18 i 21 en el marc del cribatge poblacional d'aneuploïdies en gestants. El cribatge d'aneuploïdies aplicat a Catalunya actualment contempla oferir un estudi d'ADN fetal en sang materna per al despistatge de trisomia 13,18 i 21 a aquelles gestants amb un resultat en el cribatge d'alt risc (

entre 1:10 i 1:250) o risc intermig (entre 1:250-1:1100). Tenint en compte que amb la determinació del genotip RHD fetal disposem d'una mostra a la que aïllem ADN fetal per a l'estudi del gen RHD potser en un futur ens podriem plantejar la possibilitat de fer servir aquesta mostra per a les gestants que tenen indicació de realitzar l'estudi prenatal no invasiu de despistatge d'aneuploidies.

10. BIBLIOGRAFIA

1. de Haas M, Thurik FF, Koelewijn JM, van der Schoot CE. Haemolytic disease of the fetus and newborn. *Vox Sang*. 2015 Aug;109(2):99-113. doi: 10.1111/vox.12265. Epub 2015 Apr 20. PMID: 25899660.
2. Darrow, R. R. Icterus gravis (erythroblastosis) neonatorum. An examination of etiologic considerations. *Arch Pathol*, 1938; 25: 378-417.
3. Cortés A., Muñoz-Díaz, E, León, G. "Inmunohematología básica y aplicada". Capítulo EHFRN. Primera edición. Grupo Cooperativo Iberoamericano de Medicina Transfusional. ISBN: 978-958-46-4106-9. 2014.
4. Bourgeois, L. Observations diverses, sur le aterilité, perte de fruit, foecondité, accouchements, et maladies des femmes, et enfants nouveaux naiz. 1609. Paris: Abraham Saugrain.
5. Zantek, N. D., Koepsell, S. A., Tharp, D. R. Jr., Cohn, C. S. The direct antiglobulin test: a critical step in the evaluation of hemolysis. *Am J Hematol*. 2012. Jul; 87(7):707-9.
6. Khan, S. Clinical utility of the Coombs test. *CMAJ*. 2006 Oct 10;175(8):919.
7. Jaiprakash, M., Gupta, P. K., Kumar, H. Role of gel based technique for Coomb's test. *Indian J Pathol Microbiol*. 2006 Jul; 49(3): 370-2.
8. Lai, M., Leone, G., Landolfi, R. Autoimmune haemolytic anemia with gel-based immunohematology tests. *Am J Clin Pathol* 2013 Apr; 139 (4): 457-63.
9. Diamond, L.K., Blackfan, K.D. Baty, J.M. Erythroblastosis fetalis and its association with universal oedema of the fetus, icterus gravis neonatorum, and anaemia of the new-born. *J Pediatr.*, 1932; 30: 269-309.
10. Landsteiner, K., Weiner, A.S. An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera in Rhesus blood. *So. Exp. Biol.*, 1940 New York, 2: 223.
11. Coombs, R.R.a., Mourant, A.E. and Race, R.R. Detection of weak and "incomplete Rh agglutinins". *Lancet* ii, 1945, 15.
12. Finn, R., Clarke, C. A., Donohoe W. T. A. et al. Experimental studies on the prevention of Rh haemolytic disease. *Brit. Med Jour*, 1961; J. 1:1486.
13. Levine, P. The influence of the ABO system on Rh haemolytic disease. *Hum Biol.*, 1958; 30:14-28.
14. McMaster Conference on Prevention of Rh immunization 28-30 September, 1977. *Vox Sang*, 1979; 3650-64.64.
15. Mollison, P. L. and Walker, W. Controlled trials of the treatment of haemolytic disease of the newborn. *Lancet*, 1952, 1:429.

16. Nevanlinna, H. R., Vainio, T. The influence of mother-child ABO incompatibility on Rh immunization. *Vox Sang.*, 1956, 1: 26.
17. Wallerstein, H. Treatment of severe erythroblastosis by simultaneous removal and replacement of blood of the newborn. *Science*, 1946; 103:583-584.
18. Crowther C, Middleton P. Anti-D administration after childbirth for preventing Rhesus alloimmunisation. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000; (2): CD000021.
19. National Institute for Clinical Excellence. Technology appraisal guidance. Guidance on the use of routine antenatal anti-D prophylaxis for RhD- negative women. London: NICE; 2002.
20. Mayne S, Parker JH, Harden TA, et al. Rate of RhD sensitisation before and after implementation of a community based antenatal prophylaxis programme. *BMJ* 1997; 315:1588.
21. Rodríguez-Villanueva J. Prevención de la aloinmunización materna con gammaglobulina anti-D. *Boletín de la SETS* 2007; 19 (2): 4-9.
22. Urbaniak SJ. The scientific basis of antenatal prophylaxis. *Br J Obstet Gynaecol*. 1998; 105(suppl): 11-8.
23. Koelewijn JM, de Haas M, Vrijkotte TGM, van de Schoot CI. Risk factors for RhD immunisation despite antenatal and postnatal anti-D prophylaxis. *BJOG*. 2009; 116: 1307-14.
24. Freda, V. J., Gorman, J. G., Pollack, W. Successful prevention of experimental Rh sensitization in man with an anti-Rh gamma2globulin antibody preparation. *Transfusion*, 1964; 4: 26.
25. Thornton, J. G., Page, C., Foote, G., Arthur, G. R., Tovey, L. A. D., Scott, J. S. Efficacy and long term effects of antenatal prophylaxis with anti-D immunoglobulin. *British Med J.*, 1989; 298: 1671-3.
26. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS Presence of fetal DNA in plasma matern and serum. *Lancet*. 1997 Aug 16; 350(9076):485-7.
27. Lo YM, Tein MS, Lau TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998; 62:768-775.
28. Lo YM, Zhang J, Leung TN, et al. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 218-224.
29. Bianchi DW. Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. *Br J Haematol* 1999; 105:574-583.
30. Pertl B, Bianchi DW. Fetal DNA in maternal plasma: emerging clinical applications. *Obstet Gynecol* 2001; 98:483-490.
31. Lo YM, Chiu RW. Prenatal diagnosis: progress through plasma nucleic acids. *Natur Rev* 2007; 8: 71-77.
32. Avent ND, Plummer ZE, Madgett TE, et al. Post-genomics studies and their application to non-ivasive prenatal diagnosis. *Semin Fetal Neonatl Med* 2008; 13: 91-98.

33. Legler TJ, Liu Z, Mavrou A, et al. Workshop report on the extraction of foetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 2007; 27: 824-829.
34. Poon LL, Leung TN, Lau TK, et al. Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2000; 46 :1832-1834.
35. Lo YM, Tsui NB, Chiu RW, et al. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med* 2007 ;13: 218-223.
36. Lo YM, Leung TN, Tein MS, et al. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem* 1999; 45:184-188.
37. Hahn S, Chitty LS. Noninvasive prenatal diagnosis: current practice and future perspective. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008; 20: 146-151.
38. Lo YM1, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, Poon PM, Redman CW, Wainscoat JS. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med*. 1998 Dec 10; 339(24):1734-8.
39. Finning K, Martin P, Summers J, Massey E, Poole G, Daniels G. Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *BMJ*. 2008; 336:816-8.
40. Muller SP, Bartels I, Stein W, Emons G, Gutensohn K, Köhler M, et al. The detection of the fetal D status from maternal plasma for decision making on Rh prophylaxis is feasible. *Transfusion*. 2008; 48:2292-30.
41. Avent, N.D. Antenatal genotyping of the blood groups of fetus. *Vox sang*. 1998.74, 365-374.
42. Sesarini, L.C., Giménez M.L., Redal, M.A. Non invasive prenatal genetic diagnosis of fetal RhD and sex through the analysis of free fetal DNA in maternal plasma. *Arch Argent Pediatr* 2009; 107 (5): 405-409.
43. Al-Yatama M., Mustafa A, Ali S. Detection of Y chromosome-specific DNA in the plasma and urine of pregnant women using nested polymerase chain reaction. *Prenat Diagn* 2001; 21:399-402.
44. Al-Yatama M., Mustafa A, Al-Kandari F. Polymerase-chain-reaction-based detection of fetal rhesus D and Y-chromosome-specific DNA in the whole blood of pregnant women during different trimesters of pregnancy. *Med Princ Pract* 2007; 16: 327-32.
45. Aykut A, Cotulu O, Onay H. Determination of fetal rhd status by maternal plasma DNA analysis. *Clin Genet* 2010; 78: S108.
46. Nicolaidis KH, Soothill PW, Clewell W, et al. Rh disease: intravascular fetal blood transfusion by cordocentesis. *Fetal Therapy* 1986; 1: 185.

47. Muñiz-Díaz, E., Oyonarte, S., Rodríguez-Villanueva J., Parra, J., Santiago, J.C. Protocolo de diagnóstico y prevención de la enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido. Marzo 2008.
48. Parra J, Escartin F, Salamero F. Eristroblastosis fetal. Indicaciones y riesgos de la transfusión fetal. Experiencia actual. *Prog Diag Prenat* 1994. Vol 6 N° 7.475-480.
49. Skupski DW, Wolf CFW, Bussel JB. Fetal and perinatal transfusion therapy. In: Petz LD, Swisher SN, Kleinman, Spence RK, Strauss RG (eds). *Clinical practice transfusion medicine*. Churchill Livingstone. 1996:607-622.
50. Daffos, F., Capella-Pavlovsky, M., Forestier, F. Fetal blood sampling during pregnancy with use of a needle guided by ultrasound: a study of 606 consecutive cases. *Am J Obstet Gynecol.*, 1985; 153:655-60.
51. Liley, A. W. Intrauterine transfusion of foetus in haemolytic disease. *Br Med J.*, 1963; 2:1107-9.
52. Tongsong, T., Wanapirak, C., Kunavikantikul, C., Sirirchotiyakul, S., Piyamongkol, W., Chanprapaph, P. Fetal loss rate associated with cordocentesis at midgestation. *Am J Obstet Gynecol.*, 2001; 184:719-23.
53. Van Kamp, I. L., Klumper, F. J., Oepkes, D., Meerman, R. H., Scherjon, S. A., Vandenbussche, F. P., Kanhai, H. H. Complications of intrauterine intravascular transfusion for fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. *Am J Obstet Gynecol.*, 2005; 192:171-7.
54. Scheier M, Hernandez Andrade E, Fonseca EB. Prediction of severe fetal anemia in red blood cell alloimmunization after previous intrauterine transfusions. *Am J Obstet Gynecol.* 2006. Dec;(6): 1550-6.
55. Ghidini, A., Sepulveda, W., Lockwood, C. J., Romero, R. Complications of fetal blood sampling. *Am J Obstet Gynecol.*, 1993; 168:1339-44.
56. Radunovic, N., Lockwood, C. J., Alvarez, M., Plecas, D., Chitkara, U., Berkowitz, R. L. The severely anemic and hydropic isoimmune fetus: Changes in fetal hematocrit associated with intrauterine death. *Obstet Gynecol.*, 1992; 79:390-3.
57. Klumper, F. J., van Kamp, I. L., Vandenbussche, F. P., Meerman, R. H., Oepkes, D., Scherjon, S. A, Eilers, P. H., Kanhai, H. H. Benefits and risks of fetal red-cell transfusion after 32 weeks gestation. *Eur J Obstet Gynaecol Reprod Biol.*, 2000; 92:91-6.
58. Schumacher, B., Moise, K. J. Jr. Fetal transfusion for red blood cell alloimmunization in pregnancy. *Obstet Gynecol.*, 1996; 88:137-50.
59. Hudon, L., Moise, K. J. Jr., Hegemier, S. E., Hill, R. M., Moise, A. A., Smith, E. O, Carpenter, R. J. Long-term neurodevelopmental outcome after intrauterine transfusion for the treatment of fetal hemolytic disease. *Am J Obstet Gynecol.*, 1998; 179:858-63.

60. Bowman, J. M. Controversies in Rh prophylaxis. Who needs Rh immune globulin and when should it be given? *Am J Obstet Gynecol.*, 1985; 151:289-94.
61. Bowman, J. M. The prevention of Rh immunization. *Transfus Med Rev.*, 1988; 2:129-50.
62. Lee, D., Contreras, M., Robson, S. C., Rodeck, C. H., Whittle, M. J. Recommendations for the use of anti-D immunoglobulin for Rh prophylaxis. *Transfus Med.*, 1999; 9: 93-7.
63. Koelewijn, J. M., de Haas, M., Vrijkotte, T.G. M., van der Scoot, C. E., Bonsel, G. J. Risk factors for RhD immunisation despite antenatal and postnatal anti-D prophylaxis. *BJOG*, 2009; 116: 1307-1314.
64. McCauley CJ. A review of maternal alloimmunisation to Rh D in Northern Ireland. *Transfus Med.* 2017 Apr;27(2):132-135. doi: 10.1111/tme.12387.
65. Gudlaugsson B. Rhesus D alloimmunization in pregnancy from 1996 to 2015 in Iceland: a nation-wide population study prior to routine antenatal anti-D prophylaxis. *Transfusion* 2019;1–9. doi:10.1111/trf.15635.
66. Hawksley, J.C., Lightwood, R. A contribution to the study of erythroblastosis; icterus gravis neonatorum. *Quart J Med.*,1934; 3: 155-209.
67. Gilmour, J.R. Erythroblastosis fetalis. *Arch Dis Child*, 1944; 19: 1-25.
68. Levine, P., Burnham, L., Katzin, W. M., Vogel, P. The role of isoimmunization in the pathogenesis of erythroblastosis fetalis. *Am J Obstet Gynecol.*, 1941; 42: 925-37.
69. Villegas Cruz, D., Duran Menendez, R., Alfonso Davila, A., Lopez De Roux, M., Cortina, L., Vilar Carro, M., Orbeal Aldama, L. Enfermedad hemolitica del recién nacido por incompatibilidad ABO. *Rev Cubana Pediatr.*, 2007; 79(4). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003475312007000400002&lng=es.
70. Mollison, P.L., Engelfriet, C.P., Contreras, M. *Blood transfusión in clinical medicine*, 9th Ed. Blackwerll Science, Oxford, UK. 1997.
71. Westhoff, C. M. The Rh blood group system in review: a new face for the next decade. *Transfusion.* 2004; 44: 1663-73.
72. Bruce, L. J., Guizouarn, L., Burton, N. M., Gabillat, N., Poole, J., Flatt, J. F., Brady, R. L., Borgese, F., Delaunay, J., Stewart, G. W. The monovalent cation leak in overhydrated stomatocytic red blood cells results from amino acid substitutions in the Rh-associated glycoprotein. *Blood*, 2009; 113: 1350-7.
73. Moore, S., Green, C. The identification of specific Rhesus-polypeptide-blood-group- ABH-active-glycoprotein complexes in the human red-cell membrane. *Bioch J.*, 1987; 244: 735-41.

74. Mattila, P. S., Seppala, I. J. T., Eklund, J., Makela, O. Quantitation of immunoglobulin classes and subclasses in anti-Rh(D) antibodies. *Vox Sang.*, 1985; 48: 350-6.
75. Rodeck CH, Deans A. Red cell alloimmunization. En: Rodeck CH, White MJ. Eds. *Fetal Medicine*. London: Churchill Livingstone, 1999: 785-804.
76. Gooch A, Parker J, Wray J, Querishi H. Guideline for blood grouping and antibody testing in pregnancy. *British Society for Haematology* (2007).
77. Urbaniak, S. J. Alloimmunity to RhD in humans. *Transfusion Clin Biol.*, 2006; 13: 19-22.
78. Poole, J., Daniels, G. Blood Group Antibodies and Their Significance in Transfusion Medicine. *Transfusion Med Rev.*, 2007; 21: 58-71.
79. Scott, M. Section 1A: Rh serology Coordinator's report. *Transfusion Clin Biol.*, 2002; 9: 23-9.
80. Wagner, F. F., Flegel, W. Review: The molecular basis of the Rh blood group phenotypes. *Immunohematol.*, 2004; 20: 23-36.
81. Flegel, W. A. Molecular genetics of RH and its clinical application. *Transfusion Clin Biol.*, 2006; 13: 4-12.
82. Liu, W., Avent, N. D., Jones, J. W., Scott, M. L., Voak, D. Molecular configuration of Rh D epitopes as defined by site-directed mutagenesis and expression of mutant Rh constructs in K562 erythroleukemia cells. *Blood*, 1999; 94: 3986-96.
83. Scott, M. Rh serology-Coordinator's report. *Transfusion Clin Biol.*, 1996; 3: 333-7.
84. Flegel, W. A. The genetics of the Rhesus blood group system. *Blood Transfusion*, 2007; 5: 50-7.
85. Von Zabern, I., Wagner, F. F., Moulds, J. M., Moulds, J. J., Flegel, W. A. D category VI: a group of clinically relevant and phylogenetically diverse partial D. *Transfusion*, 2013. doi: 10.1111/trf.12145.
86. Avent, N. D., Ridgwell, K., Wanner, M.j., and Anstee, D.J. Protein-sequence studies on Rh-related polypeptides suggest the presence of at least two groups of proteins which associate in the human red-cell membrane. *Biochem. J.* 1988. 256, 1043-1046.
87. Flegel, W.A. Molecular genetics of RH and its clinical application *Genetique moleculaire sur systeme RH et ses applications cliniques. Tranfus. Clin. Biol.* 2006. 13, 4-12.
88. Avent, N.D. Molecular biology of the RH blood group system. *J. Pediatr Hematol. Oncol.* 2001; 23,394-402.
89. Avent N.D. The rhesus blood group system: insights from recent advances in molecular biology. *Transfus. Med. Rev.* 1999; 13, 245-266.
90. Daniels G: Blood group antibodies in haemolytic disease of the fetus and newborn; in: Hadley A, Soothill P (eds): *Alloimmune Disorders of Pregnancy. Anaemia, Thrombocytopenia and*

Neutropenia in the Fetus and Newborn. Cambridge, Cambridge University Press, 2002:21–40.

91. Gootvall T, Filbey D. Alloimmunization in pregnancy during the years 1992-2005 in the central west region of Sweden. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2008; 87(8):843-8.
92. McCauley CJ. A review of maternal alloimmunisation to Rh D in Northern Ireland. *Transfus Med.* 2017 Apr;27(2):132-135. doi: 10.1111/tme.12387.
93. Gudlaugsson B. Rhesus D alloimmunization in pregnancy from 1996 to 2015 in Iceland: a nation-wide population study prior to routine antenatal anti-D prophylaxis. *Transfusion* 2019;1–9. doi:10.1111/trf.15635
94. Caine, M. E., Mueller-Heubach, E. Kell sensitization in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1986; 154:85-90.
95. Bowel, P.J., Brown, S.E., Dike, A. E., Inskip, M.J. The significance of anti-c alloimmunization in pregnancy. *BR J Obstet Gynaecol,* 1986: 93: 1044-4048.
96. Slootweg, Y.M., Lindenburg, I.T., Koelewijn, J.M., Van Kamp, I.L., Oepkes, D, De Haas, M. Predicting anti-Kell-mediated hemolytic disease of the fetus and newborn: diagnostic accuracy of laboratory management. *Am J Obstet Gynecol.* 2018 Oct; 219(4): 393.e1-393.e8.
97. Denomme, G.A. Kell and Kx blood group systems. *Immunohematology.* 2015;31(1):14-9.
98. García Bueno, M.J., Fernández Jiménez, B., Muñoz-Díaz, E., Parra, R. Donación autóloga en gestante con anticuerpos antieritrocitarios anti-U y anti-He”. *Med Clin.,* 2005; 124 (7): 679.
99. Parra, J., Muñoz-Díaz, E., Domínguez, C., Alejos, O., García, M.J., Guinovart, G. Protocolo para el diagnóstico y prevención de la enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido (EHFRN). Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. 2019.
100. Mari G, Deter RL, et al. Non invasive 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 (Level II-1) *N Engl J Med* 2000; 342: 9-14.
101. Pretlove SJ, Fox CE, Khan KS, Kilby MD. Noninvasive methods of detecting fetal anemia: a systematic review and meta-analysis. *BJOG* 2009; 116:1558-67.
102. Rightmire DA, Nicolaidis KH, Rodeck CH, Campbell S. Fetal blood velocities in Rh isoimmunization: relationship to gestational age and to fetal hematocrit. *Obstet Gynecol* 1986; 68: 233–236.
103. Copel JA, Grannum PA, Belanger K, Green J, Hobbins JC. Pulsed Doppler flow-velocity waveforms before and after intrauterine intravascular transfusion for severe erythroblastosis fetalis. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158: 768–774.

104. Vyas S, Nicolaides KH, Campbell S. Doppler examination of the middle cerebral artery in anemic fetuses. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162: 1066–1068.
105. Teixeira J, Duncan K, Letsky E, Fisk NM. Middle cerebral artery peak systolic velocity in the prediction of fetal anemia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2000; 15: 205–208.
106. Zimmermann R, Durig P, Carpenter R, Mari G. Longitudinal measurement of peak systolic velocity in the fetal middle cerebral artery for monitoring pregnancies complicated by red cell alloimmunisation: a prospective multicentre trial with intention-to-treat. *BJOG* 2002; 109: 746–752.
107. Deren O, Onderoglu L. The value of middle cerebral artery systolic velocity for initial and subsequent management in fetal anemia. *Eur J Obstet Gynecol* 2002; 101: 26–30.
108. Pereira, L., Jenkins, T. M., Berghella, V. Conventional management of maternal red cell alloimmunization compared with management by Doppler assessment of middle cerebral artery peak systolic velocity. *Am J Obstet Gynecol.*, 2003; 189:1002-6.
109. Nishie, E. N., Brizot, M. L., Liao, A. W., Carvalho, M. H., Toma, O., Zugaib, M. A comparison between middle cerebral artery peak systolic velocity and amniotic fluid optical density at 450 nm in the prediction of fetal anemia. *Am J Obstet Gynecol.*, 2003; 188:214-9.
110. Mari, G., Rahman, F., Olofsson, P., Ozcan, T., Copel, J. A. Increase of fetal hematocrit decreases the middle cerebral artery peak systolic velocity in pregnancies complicated by rhesus alloimmunization. *J Matern Fetal Med.*, 1997; 6:206-8.
111. Whitecar, P. W., Moise, K. J. Jr. Sonographic methods to detect fetal anemia in red blood cell alloimmunization. *Obstet Gynecol Surv.*, 2000; 55:240-50.
112. Santiago C., Manzanares S., Castillo MJ et al. Valoración del estudio Doppler de la arteria cerebral media como método diagnóstico de la anemia fetal. *Prog Obstet Ginecol* 2003; 46 (1): 1550-6
113. Nicolaides K.H., Soothill P.W., Clewell W., et al. Rh disease: intravascular fetal blood transfusion by cordocentesis. *Fetal Therapy* 1986; 1 :185.
114. Lindenburg I., Van Kamp I.L., Oepkes D. Intrauterine Blood Transfusion: current indications and associated risks. *Fetal Diagn Ther* 2014; 36:263–271. DOI: 10.1159/000362812.
115. van Kamp IL, Klumper FJ, Oepkes D, Meerman RH, Scherjon SA, Vandenbussche FP, Kanhai HH: Complications of intrauterine intravascular transfusion for fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192: 171–177.
116. van Kamp IL, Klumper FJ, Meerman RH, Oepkes D, Scherjon SA, Kanhai HH: Treatment of fetal anemia due to red-cell alloimmunization with intrauterine transfusions in the Netherlands 1988–1999. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004; 83: 731–737.

117. Oepkes D, Seaward PG, Vandenbussche FP, Windrim R, Kingdom J, Beyene J, Kanhai HH, Ohlsson A, Ryan G; DIAMOND Study Group: Doppler ultrasonography versus amniocentesis to predict fetal anemia. *N Engl J Med* 2006; 355: 156–164.
118. Lindenburg IT, Smits-Wintjens VE, van Klink JM, Verduin E, van Kamp IL, Walther FJ, Schonewille H, Doxiadis II, Kanhai HH, van Lith JM, van Zwet EW, Oepkes D, Brand A, Lopriore E; LOTUS study group: Longterm neurodevelopmental outcome after intrauterine transfusion for hemolytic disease of the fetus/newborn: the LOTUS study. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 206: 141.e1–141.e8.
119. Van Selm, M., Kanhai, H. H., Van Loon, A.J. Detection of fetomaternal haemorrhage associated with cordocentesis using serum alpha-fetoprotein and the Kleihauer technique. *Prenat Diagn.*, 1995; 15:313-6.
120. Chitrit, Y., Caubel, P., Lusina, D., Boulanger, M., Balledent, F., Schwinte, A. L., Herrero, R. Detection and measurement of fetomaternal hemorrhage following diagnostic cordocentesis. *Fetal Diagn Ther.*, 1998; 13:253-6.
121. MacGregor, S. N., Silver, R. K., Sholl, J. S. Enhanced sensitization after cordocentesis in a rhesus-isoimmunized pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.*, 1991; 165:382-3.
122. Hoch, J., Giers, G., Bald, R., Hansmann, M., Hanfland, P. [Antibody induction after intrauterine interventions]. (abstract) *Infusionsther Transfusionsmed*, 1993; 20 Suppl 2:70-3.
123. Klumper FJ, van Kamp IL, Vandenbussche FP, Meerman RH, Oepkes D, Scherjon SA, Eilers PH, Kanhai HH: Benefits and risks of fetal red-cell transfusion after 32 weeks gestation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000; 92: 91–96.
124. McKenna, D. S., Nagaraja, H. N., O’Shaughnessy, R. Management of pregnancies complicated by anti-Kell isoimmunization. *Obstet Gynecol.*, 1999; 93:667-73.
125. Leggat, H. M., Gibson, J. M., Barron, S. L., Reid, M. M. Anti-Kell in pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol.*, 1991; 98:162-5.
126. Freire-Lizama, T., Oepkes, D., Denomme, G., Seaward, G., Fernandes, B., Ryan, G. The value of serial antibody titre assessment in Kell alloimmunized pregnancies (abstract). *Am J Obstet Gynecol.*, 2001, 184:132.
127. Reali G. Forty years of anti-D immunoprophylaxis. *Blood Transfus.* 2007 Jan;5(1):3-6. doi: 10.2450/2007.0b18-06. PMID: 19204744; PMCID: PMC2535875.
128. Cortey, A., Brossard, Y. Recommandations pour la pratique clinique. Effets indésirables et information des patients. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*. Volume 35. Supplement 1, February 2006, Pages 112-118.
129. Cherif-Zahar, B., Mattei, M. G., Le Van Kim, C., Bailly, P., Cartron, J. P., Colin, Y. Localization of the human Rh blood group gene

- structure to chromosome region 1p34.3– 1p36.1 by in situ hybridization. *Hum Genet.*, 1991; 86:398-400.
130. Willy A. Flegel. The genetics of the Rhesus blood group system. *Blood Transfus* 2007; 5: 50-57.
 131. Wagner FF, Flegel WA. RHCE represents the ancestral RH position, while RHD is the duplicated gene. *Blood* 2002; 99:2272–3.
 132. Westhoff, C. M. The Rh blood group system in review: a new face for the next decade. *Transfusion.* 2004; 44: 1663-73.
 133. Chou, S. T., Westhoff CM. The Rh and RhAG blood group systems. *Immunohematology*, 2010; 26(4):178-86.
 134. Daniels, G. *Human Blood Groups*. 3rd Ed. Wiley Blackwell, Oxford UK, 2013.
 135. Avent, N. New insight in the Rh system: structure and function. *Vox Sanguinis, ISBT Science Series*, 2007; 2: 35-43.
 136. Flegel, W. A. Molecular genetics and clinical applications for RH. *Transf Apheresis Sci*, 2011;44: 81-91.
 137. Westhoff, C. M. The structure and function of the Rh antigen complex. *Semin Hematol*, 2007 ; 44(1): 42-50.
 138. Gassner, C., Doescher, A., Drnovsek, T. et al. Presence of RHD in serologically D-, C/E+ individuals: a European multicenter study. *Transfusion*, 2005; 45: 527-38.
 139. Baia, F., Muniz-Diaz, E., Boto, N., Salgado, M., Montero, R., Ventura, T. et al. A simple approach to confirm the presence of anti-D in sera with presumed anti-D+C specificity. *Blood Transfus*, 2013; 23:1-4.
 140. Apoil, P. A., Blancher, A. Rh gene evolution in primates: study of intron sequences. *Mol Biol Evol.*, 2000; 17: 127-36.
 141. Arce, M. A., Thompson, E.S., Wagner, S., Coyne, K. E., Ferdman, B. A., Lublin, D. M. Molecular cloning of RhD cDNA derived from a gene present in Rh.D positive, but not RhD-negative individuals. *Blood*, 1993; 82:651-655.
 142. Singleton, B. K., Gree, C. A., Avent, N. D., Martin, P. G., Smart, E., Daka, A. et al. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in most Africans with the Rh Dnegative blood group phenotype. *Blood*, 2000; 95:12-18.
 143. Wagner, F. F., Moulds JM, Tounkara A, Kouriba B, Flegel W. RHD allele distribution in Africans of Mali. *BMC Genet*, 2003; 4:14.
 144. Scott, M. L., Voak, D., Liu, W., Jones, J. W., Avent, N. D. Epitopes on Rh proteins. *Vox Sang*, 2000; 78 (Suppl 2):117-120.
 145. Ansart-Pirenne H, Asso-Bonnet M, Pennec PY, Roussel M. RhD variants in Caucasians consequences for checking clinically relevant alleles. *Transfusion.* 2004; 44:1282-6.
 146. Wagner, F. F., Frohmajer, A., Flegel, W. A. RHD positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genet*, 2001; 2:10.

147. Noguez, N., Tarrago, M., Subirana, L., Boto, N., Salgado, M., Ibanez, M. et al. RHD null alleles in the Spanish population. *Vox Sang*, 2007; 93 (Suppl 1):205.
148. Xu, Q., Grootkerk-Tax, M. G., Maaskant-van Wijk, P. A., van der Schoot, C. E. Systemic analysis and zygosity determination of the RHD gene in a D-negative Chinese Han population reveals a novel D-negative RHD gene. *Vox Sang*, 2005; 88:35-40.
149. Lomas, C., Tippett, P., Thompson, K. M. Relamed MD, Hugues-Jones NC. Demonstration of seven epitopes on the Rh antigen D using human monoclonal anti-D antibodies and red cells from D categories. *Vox Sang*, 1989; 57:261-264. Bruce, L. J., Guizouarn, L., Burton, N. M.,
150. Gabillat, N., Poole, J., Flatt, J. F., Brady, R. L., Borgese, F., Delaunay, J., Stewart, G. W. The monovalent cation leak in overhydrated stomatocytic red blood cells results from amino acid substitutions in the Rh-associated glycoprotein. *Blood*, 2009; 113: 1350-7.
151. Callebaut, I., Dulin, F., Bertrand, O., Ripoche, P., Mouro, I., Colin, Y., Mornon, J. P., Cartron, J. P. Hydrophobic cluster analysis and modeling of the human Rh protein three-dimensional structures. *Transfusion Clin Biol.*, 2006; 13: 70-84.
152. Shao, C. P., Maas, J. H., Su, Y. Q., Kohler, M., Legler, T. J. Molecular background of Rh D-positive, D-negative, D(el) and weak D phenotypes in Chinese. *Vox Sang*, 2002; 83: 156-61.
153. Denomme, G. A., Wagner, F. F., Fernandez, B. J., Li, W., Flegel, W. Partial D, weak D types and novel RHD alleles among 33864 multiethnic patients: implications for anti-D alloimmunization and prevention. *Transfusion*, 2005; 45:1574-1580.
154. Burton, N. M., Anstee, D. J. Structure, function and significance of Rh proteins in red cells. *Current Opinion Hematol.* 2008; 15: 625-30.
155. Van Kim, C. L., Colin, Y., Cartron, J. P. Rh proteins: key structural and functional components of the red cell membrane. *Blood Rev.*, 2006; 20: 93-110.
156. Moore, S., Green, C. The identification of specific Rhesus-polypeptide-blood-group- ABH-active-glycoprotein complexes in the human red-cell membrane. *Bioch J.*, 1987; 244: 735-41.
157. Wagner, F. F., Gassner, C., Muller, T. H., Schonitzer, D., Schunter, F., Flegel, W. A. I. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood*, 1999; 93: 385-93.
158. Muller, T. H., Wagner, F. F., Trockenbacher, A., Eicher, N. I., Flegel, W. PCR screening for common weak D types shows different distributions in three central European populations. *Transfusion*, 2001; 41:45-52.
159. Denomme, G. A., Wagner, F. F., Fernandez, B. J., Li, W., Flegel, W. Partial D, weak D types and novel RHD alleles among 33864

- multi ethnic patients: implications for anti-D alloimmunization and prevention. *Transfusion*, 2005; 45:1574-1580.
160. Wagner, T., Kormoczi, G. F., Buchta, C. et al. Anti-D immunization by DEL red blood cells. *Transfusion*, 2005; 45: 520-6.
 161. Ohto, H., Yasuda, H. Response to: are weak D RBCs really immunogenic? *Transfusion*, 2006; 46:1065.
 162. Bank Clausen F, Dmakjaer MB, et al. Noninvasive fetal RhD genotyping. *Transfusion and Apheresis Science* 50 (2014) 154-162.
 163. Chan, K.C., Zhang, J. Hui, A. B., et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin. Chem.* (2004) 50, 88-92.
 164. Stanghellini I, Bertorelli R, Capone L et al. Quantitation of fetal DNA in maternal serum during the first trimester of pregnancy by the use of a DAZ repetitive probe. *Mol Hum Reprod* 2006; 12:587-591.
 165. Hromadnikova I, Houbova B, Hridelova D et al. Replicate real – time PCR testing of DNA in maternal plasma increases the sensitivity of non-invasive fetal sex determination. *Prenat Diagn* 2003; 23: 235-238.
 166. Hyett JA, Gardener G, Stojilkovi-Mikic T et al. Reduction in diagnostic and therapeutic interventions by non-invasive determination of fetal sex in early pregnancy. *Prenat Diagn* 2005; 25: 1111-1116.
 167. Gonzalez-Gonzalez MC, García Hoyos M. Trujillo MJ et al. Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 2002;22: 946-948.
 168. Nasis O, Thompson S, Hong T et al. Improvement in sensitivity of allele-specific PCR facilitates reliable non-invasive prenatal detection of cystic fibrosis. *Clin Chem* 2004; 50:694-701.
 169. Li Y, Di Naro E, Vitucci A, Zimmerman B, Holzgreve W, Hahn S. Detection of paternally inherited fetal point mutations for beta-thalassaemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma. *JAMA* 2005; 293: 843-849.
 170. Chiu RW, Lau TK, Cheung TN, Lo YM. Prenatal exclusion of beta thalassaemia major by examination of maternal plasma. *Lancet* 2002; 360: 998-1000.
 171. Akolekar R, Farkas DH, VanAgthmael AL, et al. Fetal sex determination using circulating cell-free fetal DNA (ccffDNA) at 11 to 13 weeks of gestation. *Prenat Diagn* 2010; 30: 918-923.
 172. Faas BH, Beuling EA, Christiaens GC, et al. Detection of fetal RHD-specific sequences in maternal plasma. *Lancet*.1998; 352(9135):1196.
 173. Finning KM, Martin PG, Soothill PW, Avent ND. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion*. 2002; 42(8):1079-85.

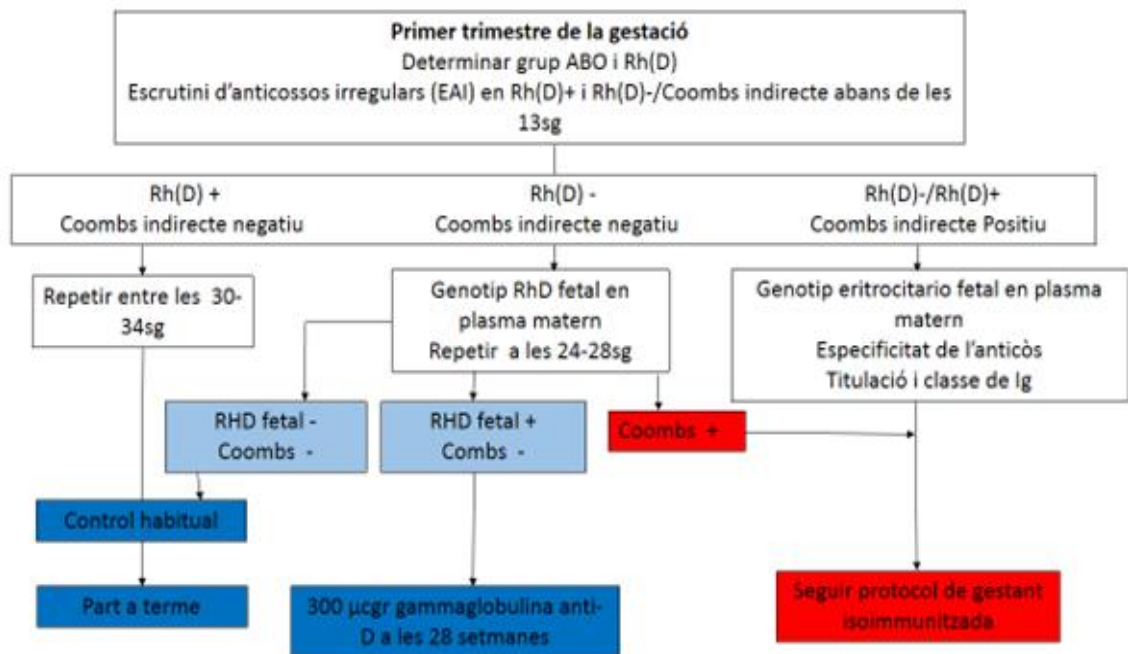
174. Gautier E, Benachi A, Giovangrandi Y, et al. Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: a two-year experience. *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 192(3):666-9.
175. Grootkerk-Tax MG, Soussan AA, de Haas M, et al. Evaluation of prenatal RHD typing strategies on cell-free fetal DNA from maternal plasma. *Transfusion.* 2006; 46(12):2142-8.
176. van der Schoot CE, Soussan AA, Koelewijn J, Bonsel G, Paget-Christiaens LG, de Haas M. Non-invasive antenatal RHD typing. *Transfus Clin Biol* 2006; 13: 53–7.
177. Gautier E, Benachi A, Giovangrandi Y, Ernault P, Olivi M, Gaillon T, et al. Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: a two-year experience. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192: 666–9.
178. Rouillac-Le Sciellour C, Puillandre P, Gillot R, Baulard C, Metral S, Le Van KC, et al. Large-scale pre-diagnosis study of fetal RHD genotyping by PCR on plasma DNA from RhDnegative pregnant women. *Mol Diagn* 2004; 8: 23–31.
179. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; 55: 611–22.
180. Amaral DRT, Credidio DC, Pellegrino JJ, Castilho L. Fetal RHD genotyping by analysis of maternal plasma in a mixed population. *J Clin Lab Anal.* 2011; 25:100-4.
181. Singleton BK, Green CA, Avent ND, et al. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood* 2000; 95:12-8.
182. Daniels GL, Faas BH, Green CA, et al. The VS and V blood group polymorphisms in Africans: a serologic and molecular analysis. *Transfusion* 1998; 38: 951-8.
183. Tax MG, van der Schoot CE, van Doorn R, et al. RHC and RHc genotyping in different ethnic groups. *Transfusion* 2002; 42:634-44.
184. Bennett PR, Warwick R, Letsky E, et al. Determination of fetal RhD type by DNA amplification from fetal skin following massive fetomaternal haemorrhage and intrauterine fetal death. *Br J Obstet Gynaecol* 1994; 101: 636-7.
185. Wolter LC, Hyland CA, Saul A. Rhesus D genotyping using polymerase chain reaction. *Blood* 1993; 82: 1682-3.
186. Denomme GA, Akoury H, Sermer M, et al. RhD status of a fetus at risk for haemolytic disease with a discrepant maternal DNA-based RhD genotype. *Prenat Diagn* 1999; 19: 424-7.
187. Daniels G, van der Schoot CE, Olsson ML. Report of the First International Workshop on molecular blood group genotyping. *Vox Sang* 2005; 88: 136-42.
188. Gregory A, Fernandes D. Fetal blood group genotyping. *Transfusion.* Volume 47, July 2007 Supplement.

189. Daniels G, Finning K, Martin P, Soothill P. 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 Sanguinis* (2004) 87, 225–232.
190. Geifman-Holtzman O, Grotegut CA, Gaughan JP. Diagnostic accuracy of noninvasive fetal Rh genotyping from maternal blood – a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195: 1163–73.
191. Finning K, Martin P, Summers J, Daniels G. Fetal genotyping for the K (Kell) and Rh C, c, and E blood groups on cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Transfusion*. 2007; 47:2126-33.
192. Muller SP, Bartels I, Stein W, et al. Cell-free fetal DNA in specimen from pregnant women is stable up to 5 days. *Prenat Diagn*. 2011; 31:1300-4.
193. Akolekar R, Finning K, Kuppusamy R, et al. Fetal RHD genotyping in maternal plasma at 11-13 weeks of gestation. *Fetal Diagn Ther*. 2011; 29:301-6.
194. van der Schoot, E; de Haas, M. “Genotyping to prevent Rh disease: has the time come?” *Current Opinion. Transfusion medicine and immunohematology*. Vol 24. Number 00. Month 2017.
195. Chitty LS, Finning K, Wade A, et al. Diagnostic accuracy of routine antenatal determination of fetal RHD status across gestation: population based cohort study. *BMJ* 2014; 349: g5243
196. Sekizawa A, Purwosunu Y, Matsuoka R, et al. Recent advances in non-invasive prenatal DNA diagnosis through analysis of maternal blood. *J. Obstet. Gynaecol. Res*. Vol. 33, No. 6: 747–764, December 2007.
197. van der Schoot C.E, Thurik F.F, Scheffer P.G, et al. Non-invasive prenatal diagnosis – erythrocyte and platelet antigens. *ISBT Science Series* (2015) 10 (Suppl. 1), 192–196.
198. van der Schoot C.E, de Haas M, Engelfriet C.P, et al. Genotyping for red blood cell polymorphisms. *Vox Sanguinis* (2009) 96, 167–179.
199. Macher HC, Noguero P, Medrano-Campillo P, et al. Standardization non-invasive fetal RHD and SRY determination into clinical routine using a new multiplex RT-PCR assay for fetal cell-free DNA in pregnant women plasma: results in clinical benefits and cost saving. *Clin Chim Acta*. 2012; 413:490-4.
200. Wikman AT, Tiblad E, Karlsson A, et al. Noninvasive Single-Exon Fetal RHD Determination in a Routine Screening Program in Early Pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2012; 120: 227-34.
201. National Institute for Health and Care Excellence. *Diagnosis guidance 25. High-throughput non-invasive prenatal testing for fetal RHD genotype*. London: NICE; 2016.
202. Thurik, F.F. “Analyses of false-positive results of fetal RHD typing in a national screening program reveals vanishing twins as

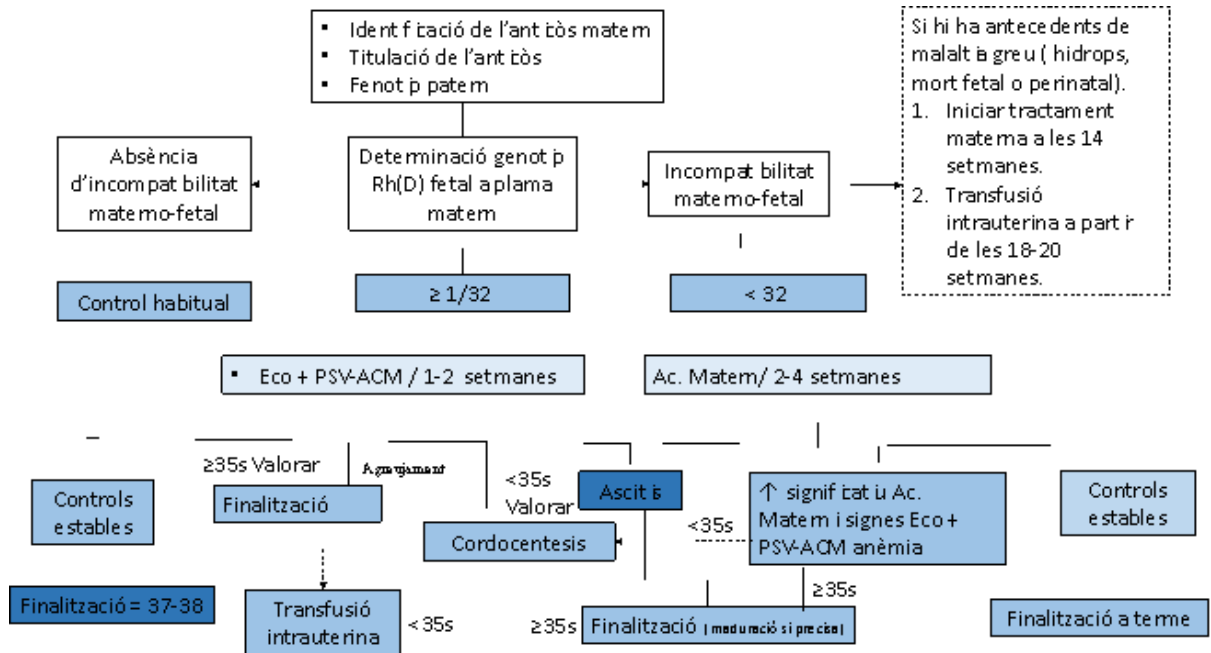
- potential cause of discrepancy” *Prenatal Diagnosis* 2015 Aug; 35(8): 754-760.
203. Hyland C.A, Gardener G.G, Baidya S, et al. A case of suspected confined placental chimerism following detection of fetal RHD signals in maternal plasma discordant with the newborn serology. Poster on Australian Red Cross Blood Service. 2016.
 204. Daniels G, Finning K, Martin P, Massey E. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal blood group phenotypes: current practice and future prospects. *Prenat Diagn.* 2009; 29:101-7.
 205. Costa JM, Giovangrandi Y, Ernault P, Lohmann L, Nataf V, El Halali N, et al. Fetal RHD genotyping in maternal serum during the first trimester of pregnancy. *Br J Haematol* 2002; 119: 255–60.
 206. Bombard AT, Akolekar R, Farkas DH, et al. Fetal RHD genotype detection from circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma in non-sensitized RhD negative women. *Prenat Diagn* 2011; 31:802–8.
 207. Moise KJ. Fetal RhD typing with free DNA in maternal plasma. *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 192:663-5.
 208. Szczepura A, Osipenko L, Freeman K. A new fetal RHD genotyping test: costs and benefits of mass testing to target antenatal anti-D prophylaxis in England and Wales. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2011; 18(11):5.
 209. de Haas M., van der Ploeg CPB, Scheffer PG, Verlinden DA, Hirschberg H, Abink F, and van der Schoot CE. A nation-wide fetal RHD screening programme for targeted antenatal and postnatal anti-D. *ISBT Science Series* 2012; 7: 164-167.
 210. Hawk AF, Chang EY, Shields SM, Simpson KN. Costs and clinical outcomes of non-invasive fetal RhD typing for targeted prophylaxis. *Obstet Gynecol* 2013; 122: 579-585.
 211. 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.
 212. Randen I, Hauge R, Kjeldsen-Kragh J & Fagerhol M.K. Prenatal genotyping of RHD and SRY using maternal blood. *Vox Sanguinis* (2003) 85, 300–306.

11. ANNEXOS

11.1. ANNEX 1. ESTUDI IMMUNOHEMATOLÒGIC DE LES GESTANTS. PROTOCOL PER AL DIAGNÒSTIC I LA PREVENCIÓ DE LA MALALTIA HEMOLÍTICA DEL FETUS I DEL RECENT NASCUT (MHFN). HSP. 2019.



11.2. ANNEX 2. PROTOCOL DE MANEIG DE LA GESTANT ISOIMMUNITZADA. PROTOCOL PER AL DIAGNÒSTIC I LA PREVENCIÓ DE LA MALALTIA HEMOLÍTICA DEL FETUS I DEL RECENT NASCUT (MHFN). HSP. 2019.



11.3. ANNEX 3. GUIA CLÍNICA DE DETERMINACIÓ DEL GENOTIP RHD FETAL EN PLASMA MATERN.

SERVEI D'OBSTETRÍCIA I GINECOLOGIA - HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU
GUIA CLÍNICA: DETERMINACIÓ GENOTIP Rh FETAL EN PLASMA MATERN.
Actualització: abril 2014



DETERMINACIÓ GENOTIP Rh FETAL EN PLASMA MATERN.

Autors: Dra. A. Bosch (Banc de Sang), Dr. J. Armengol, Dr. J. Parra (Servei d'Obstetrícia i Ginecologia)

Data de revisió: abril 2014

1. Objectiu del protocol

Identificar el genotip Rh fetal en sang materna a les gestants Rh negatives per tal d'evitar l'administració innecessària de la gammaglobulina anti-D en els casos en què s'estableix que el fetus és també Rh negatiu.

2. Mètode

Identificació d'ADN fetal en plasma matern, a partir del qual es determina el genotip Rh.

3. Consideracions prèvies

- El processament de la mostra s'ha de fer en les primeres 24 hores després de la seva obtenció. Per això, des d'un punt de vista pràctic, l'extracció per aquesta analítica no es farà en divendres ni vigílies de festiu.
- En les fases inicials de la gestació pot no ser possible la detecció d'ADN fetal en el plasma matern, per això pot passar que en l'analítica del primer trimestre (8-13 setmanes) no es pugui fer la determinació.
- En una primera fase farem la determinació en dos temps (primer i segon trimestre). L'analítica en el primer trimestre (8-12 setmanes) ens permetrà estudiar la possibilitat de validar la tècnica en les etapes precoces de la gestació; l'analítica del segon trimestre (24 setmanes) ens donarà el resultat abans de les 28 setmanes, per tal de poder establir la indicació de l'administració de la gammaglobulina anti-D.

4. Sol·licitud de la prova

4.1. Primer trimestre (8-12 setmanes)

A **TOTES** les gestants, en la petició de l'analítica del primer trimestre, s'hi inclourà la petició de "Determinació de genotip Rh fetal en plasma matern". Aquesta petició ja està inclosa en el "perfil analític" del Servei "Gestació - 1r Trimestre", també es pot seleccionar al peticionari a través dels prismàtics entre els ítems del Banc de Sang.

Al laboratori es farà primer la determinació del grup sanguini i Rh matern, i en cas que la gestant sigui Rh negativa es trametrà la mostra per a la determinació del genotip Rh fetal.

4.2. Segon trimestre (24 setmanes)

En aquest moment es farà la sol·licitud de la prova NOMÉS A LES GESTANTS Rh NEGATIVES de les que no tinguem constància del genotip Rh fetal en el primer trimestre.

Pel fet de no ser rutinària, no s'ha inclòs la sol·licitud en el perfil analític "Gestació – 2n Trimestre", de manera que s'ha de seleccionar a través del catàleg de peticions.

5. Resultats

Els resultats de la prova es podran consultar a l'ETC a la pestanya "Documents Clínics", seleccionant dintre de "Laboratoris" l'opció "Banc de Sang". També seran consultables a través de la pàgina web:

- Accés a la pàgina web del Banc de Sang
<http://www.bancsang.net>
- Cal anar a l'apartat de "professionals" i accedir a "Consulta resultats del laboratori".
- Llavors demana l'Usuari i password. S'ha donat un usuari i password a nom dels caps del servei. En el nostre cas l'usuari autoritzat és el cap del nostre servei Dr. Joaquim Calaf. Representa que entrem amb el seu usuari i pasword

USUARI: **EWEB00204**

Password: **obstetricia**

6. Proves invasives

En el cas que sigui necessària la realització de proves invasives (biòpsia de còrion/amniocentesi) la sol·licitud de l'estudi i l'extracció de sang materna es realitzaran a la consulta d'Ecografia/Diagnòstic Prenatal el mateix dia de la intervenció. El resultat estarà disponible pels canals indicats en l'apartat anterior en el moment de fer l'ecografia de control postpunció, de manera que en aquell moment es disposarà de la informació necessària per tal d'indicar o no l'administració de la gammaglobulina anti-D.

11.4. ANNEX 5. DICTAMEN FAVORABLE DEL COMITÈ ÈTIC D'INVESTIGACIÓ CLÍNICA.



Sant Antoni Ma Claret, 167 · 08026 Barcelona
Tel. 93 291 90 00 · Fax 93 291 94 27
e-mail: santpau@santpau.cat
www.santpau.cat

DICTAMEN DEL COMITÈ ÈTIC DE INVESTIGACIÓ CLÍNICA

Doña Milagros Alonso Martínez, Secretaria del Comitè Ètic de Investigació Clínica de la Fundació de Gestió Sanitària del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona,

CERTIFICA

Que este Comitè ha evaluado la propuesta del promotor, para que se realice el estudio observacional:

TÍTULO: Aplicación en la práctica clínica de la determinación prenatal no invasiva del genotipo RhD fetal durante el primer trimestre de la gestación en gestantes RhD negativas - (IIBSP-RHD-2016-18) - OBDULIA ALEJOS ABAD			
PROMOTOR: INSTITUT DE RECERCA HSCSP			
CÓDIGO	Nº EudraCT	VERSIÓN	Ref. HSCSP
IIBSP-RHD-2016-18	NO PROCEDE	v.1 de fecha 18/02/2016	16/070 (OBS)

Y considera que:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, teniendo en cuenta los beneficios esperados.
- La capacidad de los investigadores y las instalaciones y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como el plan de reclutamiento de los sujetos.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.

Por tanto este CEIC acepta que dicho estudio observacional sea realizado en el **Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona)** por la investigadora principal O. Alejos.

Lo que firmo en Barcelona, a 13 de abril de 2016


FUNDACIÓ DE GESTIÓ SANITÀRIA DE
L'HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU
COMITÈ ÈTIC D'INVESTIGACIÓ CLÍNICA
Dra. Milagros Alonso Martínez

TÍTULO: Aplicación en la práctica clínica de la determinación prenatal no invasiva del genotipo RhD fetal durante el primer trimestre de la gestación en gestantes RhD negativas - (IIBSP-RHD-2016-18) - OBDULIA ALEJOS ABAD			
PROMOTOR: INSTITUT DE RECERCA HSCSP			
CÓDIGO	Nº EudraCT	VERSIÓN	Ref. HSCSP
IIBSP-RHD-2016-18	NO PROCEDE	v.1 de fecha 18/02/2016	16/070 (OBS)

Dña. **MILAGROS ALONSO MARTÍNEZ**, SECRETARIA DEL COMITÈ ÈTIC DE INVESTIGACIÓ CLÍNICA DE LA FUNDACIÓ DE GESTIÓ SANITÀRIA DEL HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU DE BARCELONA,

HACE CONSTAR QUE:

- 1º En la reunión celebrada el día 12 de abril de 2016, se decidió emitir el informe correspondiente al estudio de referencia.
- 2º En dicha reunión se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente – Real Decreto 223/2004 – para que la decisión del citado CEIC sea válida.
- 3º El CEIC del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, tanto en composición como en sus PNTs, cumple con las normas de BPC.
- 4º La composición del CEIC del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau es el siguiente:

Presidente:

Dr. Antonio López Pouso. Médico. Especialista en Oncología Médica

Vicepresidente:

Dr. Gerard Urrutia Cuchi. Médico. Especialista en Epidemiología.

Secretaria:

Dra. Milagros Alonso Martínez. Médico. Especialista en Farmacología Clínica. Máster en Bioética y Derecho. Comité de Ética Asistencial.

Vocales:

Sra. Ester Amado Guirado. Farmacéutica de Atención Primaria.
Sra. Mª Teresa Ricart Basagaña. Diplomada en Enfermería.
Dr. Josep Corbella Duch. Doctor en Derecho. Comité de Ética Asistencial.
Dr. Francesc Jané Carrencà. Médico. Especialista en Farmacología Clínica.
Dr. Xavier León Vintró. Médico. Especialista en Otorrinolaringología.
Dr. Jordi Mancobo Cortés. Médico. Especialista en Medicina Intensiva.
Sra. Estela Moreno Martínez. Farmacéutica. Especialista en Farmacia Hospitalaria.
Dr. Javier Pagonabarraga Mora. Médico. Especialista en Neurología.
Sra. Mª Virtudes Pacheco. Asistente social. Unidad de Atención al Usuario.
Sra. Margarida Messeguer Rofes. Persona ajena a las profesiones sanitarias y a la Institución.

Barcelona, a 13 de abril de 2016



INSTITUT DE RECERCA HSCSP
HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU
COMITÈ ÈTIC D'INVESTIGACIÓ CLÍNICA

Dra. Milagros Alonso Martínez

11.5. ANNEX 6. CONFORMITAT DE LA DIRECCIÓ DEL CENTRE.



Sant Antoni Ma Claret, 167 - 08025 Barcelona
Tel. 93 291 90 00 - Fax 93 291 94 27
e-mail: santpau@santpau.cat
www.santpau.cat

CONFORMIDAD DE LA DIRECCIÓN DEL CENTRO

Don Alessandro Sionis, en su calidad de Director Médico de la Fundació de Gestió Sanitària de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y vista la autorización del Comité Ético de Investigación Clínica,

CERTIFICA:

Que conoce la propuesta del promotor **INSTITUT DE RECERCA HSCSP**, para que sea realizado en este Centro el estudio observacional titulado: **"Aplicación en la práctica clínica de la determinación prenatal no invasiva del genotipo RhD fetal durante el primer trimestre de la gestación en gestantes RhD negativas"**.

CÓDIGO: **IIBSP-RHD-2016-18**

Nº EUDRACT: **NO PROCEDE**

INVESTIGADOR PRINCIPAL: **Obdulia Alejos / S. Ginecología y Obstetricia.**

Que acepta la realización de dicho estudio observacional en este Centro.

Lo que firma en Barcelona, a 05 de Mayo de 2016.



12. PRODUCCIÓ CIENTÍFICA

12.1. PRESENTACIÓ A CONGRESSOS

O Alejos Abad; N Nogués Galvez; E Muñoz-Díaz; A Bosch Llobet; J Armengol SantaCreu; J Parra Roca.

“Incompatibilidad RhD: profilaxis selectiva tras determinación sistemática del genotipo RhD fetal en sangre materna en primer trimestre de gestación. Resultados de la primera experiencia piloto en Cataluña”

“33 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia” celebrat a Bilbao, del 16 al 20 de Juny de 2015.

Nogués N., **Alejos O.**, Ibañez M., Farssac E., Domeque M., Canals C., Bosch M.A., Parra J., Muñoz-Díaz E.

“Cribaje prenatal no invasivo de gestantes RHD negativo mediante determinación del genotipo RHD fetal en el primer trimestre: primer estudio piloto en Cataluña”.

“26 Congreso SETS” celebrado en Sevilla del 11 al 13 de Junio, ha recibido el **premio al mejor Trabajo en el área de “Premio Durán i Jordá en el área de transfusión e inmunohematología” 2015 celebrada a Sevilla al Juny del 2017.**

Premio a la mejor iniciativa en promoción de la donación.

Tipus de participació: participació en l’elaboració.

Obdulia Alejos Abad, Nuria Nogués Galvez, Eduardo Muñoz-Díaz, Alba Bosch, Josep Armengol SantaCreu, Juan Parra Roca.

“Incompatibilidad RhD: profilaxis selectiva tras la determinación sistemática del genotipo RhD fetal en sangre materna en el primer trimestre de la gestación. Resultados de la primera experiencia piloto en Cataluña”

“Comunicació oral elevada a la categoria de ponència” i que va participar a la “Mesa Debate de Comunicaciones de Medicina Perinatal”.

Aquesta comunicació va ser becada com a un dels “mejores trabajos seleccionado”, posteriormente, como “semifinalista” y en último lugar como “finalista”.

“34º Edición Nacional Formación SEGO 2017” celebrada a Oviedo del 12 al 16 de Juny de 2017.

Tipus de participació: ponent, autora i responsable de la coordinació/ revisó. Idea original.

Alejos Abad O, Nogués N, Parra Roca J, Chavaría Urquila V, Armengol SantaCreu J, Muñoz-Díaz E, Ollé Ramos N, Calaf Alsina J.

“Antenatal immunoprophylaxis after systematic non-invasive fetal RhD determination during first trimestre of gestation”

“18th World Congress in Fetal Medicine” celebrat a Alacant del 25 al 29 de Juny del 2019.