
















Genotipificación fetal RHD no invasiva en plasma materno: hacia una mejor atención materna e infantil en Uruguay

Gabriela Rivas^{1*} , Virginia Marcalain^{1,6} , Hany Pérez¹ , Luciano Fernández¹ , Daniela Saliwonzky¹ ,
Valentina Silveira³ , Juan Recouso² , Juan Andrés Abin-Carriquiry⁵ , Patricia Moerzinger⁵ ,
Virginia Bengochea⁵ , Sofia Dietrich⁵ , Pablo López⁴ , Vania Medina⁴ , Francisco Coppola²,
Ismael Rodríguez¹ , Fernanda Blasina³ 

¹Unidad Académica de Medicina Transfusional y Hemoterapia, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

²Unidad Académica Ginecotocológica B, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

³Unidad Académica de Neonatología, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

⁴Laboratorio de Patología Clínica, área de Biología Molecular, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Udelar, Montevideo, Uruguay

⁵Laboratorio ATGen, Montevideo, Uruguay

⁶Médica Uruguaya Corporación de Asistencia Médica, Montevideo, Uruguay

Recepción: 22-03-2025

Aceptación: 12-12-2025

*Correspondencia: Gabriela Rivas. gabrielarivasalen@gmail.com

Resumen

La normativa uruguaya exige la determinación serológica de RhD en toda diada materno-neonatal. La genotipificación del "gen RHD" fetal en sangre materna, realizada con un kit de desarrollo nacional, permite identificar díadas materno-fetales de igual grupo, lo que podría evitar la profilaxis con inmunoglobulina anti-D.

Se trató de un estudio multicéntrico prospectivo, descriptivo, de cohorte única de pacientes, de 92 gestantes RhD negativas, no aoinmunizadas, cursando embarazos con feto único. Se extrajo una muestra de sangre periférica entre las semanas 17 y 28 de gestación. Se utilizó el kit de detección molecular del gen RHD del Laboratorio ATGen, que consiste en un PCR en tiempo real en formato multiplex con sondas TaqMan, permitiendo amplificación simultánea y diferencial de tres regiones del gen RHD (exones 5, 7 y 10). Se compararon los resultados con la determinación RhD serológica en sangre de cordón neonatal (método de referencia).

De 92 muestras, 5 fueron descartadas por no cumplir con los criterios de inclusión del presente estudio (2 correspondientes a madres RhD positivas y 3 por problemas preanalíticos). Cincuenta y siete muestras fueron positivas para los tres exones evaluados, con valores de Ct concordantes y cumpliendo los criterios de adecuación definidos en el inserto del kit ($Ct_{\leq 37}$). De estas 57 muestras maternas, el neonato fue positivo mediante serología del antígeno RhD postnacimiento. Las muestras negativas para el gen RHD fetal ($n=30$) fueron negativas para los tres exones del kit, y se confirmó que, en sangre de cordón, el antígeno RhD era negativo. El kit molecular de producción nacional identificó los tres exones fetales en plasma materno, con sensibilidad y especificidad de 100%, incorporando en Uruguay esta nueva tecnología.

Palabras clave: Sistema rhesus (RHD). Inmunoprofilaxis anti-D. Genotipo fetal-sangre materna. Gestantes Rh negativo. PCR-RT-gen RHD.

Introducción

La Medicina Transfusional y Hemoterapia es una especialidad técnico-médica que se encuentra presente en Uruguay desde hace 70 años, representada por una Unidad Académica de la Facultad de Medicina.

En el marco de la investigación desarrollada desde esta Unidad, en 2018 se avanzó en el estudio de grupos sanguíneos y su importancia en la clínica, así como en el desarrollo de protocolos y la introducción de nuevas tecnologías para el diagnóstico en Uruguay¹. El objetivo de este proyecto es disponer de una nueva propuesta diagnóstica en las gestantes Rh(D) negativo.

La aloinmunización materna vinculada al grupo sanguíneo RhD ha transitado, desde su descubrimiento en 1939, a cargo de Karl Landsteiner junto con A. S. Weiner, por vertiginosos cambios desde el punto de vista de las transfusiones de sangre y, posteriormente, por su asociación con la mortalidad de los recién nacidos y fetos².

Este antígeno se encuentra ausente en el 15% de la población, lo que determina el carácter de RhD negativo y, en el caso de la gestación, la exposición a sangre RhD positivo de origen paterno puede determinar el desarrollo de la aloinmunización anti-D materno^{3,4}.

En la década del 70 del siglo pasado se inició la administración de inmunoglobulina anti-D como forma de protección para las gestantes RhD negativas. Este hito de la Medicina Transfusional perinatal cambió la curva con una inflexión de la historia natural de la enfermedad hemolítica fetoneonatal (EHFN), disminuyendo la aloinmunización materna de 14% al 1,5% y, en consecuencia, la EHFN⁵⁻⁸.

La Medicina Transfusional ha tenido un crecimiento y expansión que refleja su vinculación con todas las especialidades implicadas directamente en el diagnóstico y tratamiento, adquiriendo un rol fundamental en la Ginecoobstetricia y la Pediatría/Neonatología en la prevención de la aloinmunización materna y el tratamiento de la EHFN. La UdelaR fue pionera en esta línea de trabajo, ya que desde hace más de 35 años se administra la inmunoglobulina anti-D específica en el puerperio en Uruguay, de manera obligatoria según la normativa vigente, labor por la que los autores fueron premiados por la Academia Nacional de Medicina del año 1982⁹. Posteriormente, se implementaron intervenciones secuenciales orientadas a mejorar los resultados en esta enfermedad, reguladas por la autoridad sanitaria. En 2004 se actualizó la guía de seguimiento de la gestante en la prevención de la aloinmunización, sugiriendo la inmunoprofilaxis antenatal a las 28 semanas. Por último, en 2011, se incorporó la obligatoriedad de la prevención de la aloinmunización en la etapa antenatal a partir de las

28 semanas de edad gestacional, con la administración de inmunoglobulina anti-D específica^{10,11}.

Es así que, mediante las intervenciones implementadas en las últimas tres décadas, se han logrado cifras de aloinmunización materna por antígeno D comparables con las cifras internacionales: 0,2% al 0,4% en Uruguay^{12,13}.

Desde la última intervención en 2011 a la fecha, han surgido nuevas herramientas para optimizar la atención durante la gestación, con excelentes resultados neonatales. Una de ellas es la determinación del gen RHD en sangre materna¹⁴⁻¹⁶, que permite identificar a aquellas gestantes que portan un feto RhD positivo y que requieren la administración de inmunoglobulina anti-D durante la gestación, separando de aquellos fetos RhD negativos, que, al compartir el mismo grupo que su madre, no requerirían la inmunoglobulina anti-D. En la actualidad existen otras intervenciones para mejorar el manejo de la enfermedad, como el cálculo de la hemorragia feto-materna (HFM), el cálculo de dosis ajustada de la inmunoprofilaxis anti-D y el ensayo en monocapa de monocitos (*monocyte monolayer assay [MMA]*), técnicas que aún se encuentran en desarrollo en la práctica clínica rutinaria de nuestro país.

Dado que la aloinmunización es una condición que persiste durante toda la vida del individuo y que, para el antígeno D, es la única para la cual se dispone de un tratamiento preventivo desde la gestación, es de vital importancia adoptar oportunamente las conductas de intervención para su prevención, como la aplicación de la inmunoprofilaxis anti-D^{4,17}. En este sentido, es necesario racionalizar el uso de la inmunoglobulina anti-D, dado que se trata de un hemoderivado proveniente del plasma humano, con un elevado costo para el Sistema Integrado de Salud, que garantiza cobertura equitativa a toda la población.

De acuerdo con los datos recabados en el Hospital de Clínicas a partir del Sistema Informático Perinatal (SIP), entre el 2008 y 2018 se identificó un 27% de madres Rh(D) negativas que eran portadoras de fetos Rh(D) negativos. Este hecho implica que este grupo de embarazadas recibió inmunoprofilaxis anti-D durante la gestación de forma innecesaria y se sometió a controles seriados de determinación de aloinmunización a lo largo del embarazo. Esta situación es representativa de lo que sucede a nivel nacional. Esta brecha entre la normativa que indica la administración de la inmunoprofilaxis a toda gestante Rh(D) negativa, aun con un feto del mismo grupo, pone de manifiesto la necesidad de avanzar en la detección del genotipo fetal durante la gestación, identificando aquellos fetos que, al ser RhD negativos, podrían ser pasibles a futuro de evitar la inmunoprofilaxis en una madre cuyo feto no tiene posibilidad de desarrollar la enfermedad. Asimismo, evitaría la monitorización innecesaria en

este grupo de pacientes, reduciría los costos, evitaría efectos no deseados en una población sin beneficio clínico y disminuiría los riesgos de iatrogenia.

Nos planteamos el objetivo de evaluar el desempeño del método de detección molecular del gen RHD fetal a través de sangre materna, en términos de sensibilidad y especificidad, enfrentándolo al método de referencia posnacimiento, que es el estudio serológico en sangre de cordón. Este kit permite el estudio en embarazos de madres RhD negativas.

Materiales y métodos

En este trabajo se estudiaron casos provenientes de la Maternidad Universitaria, que recibe gestantes de todo el país para su asistencia, y de otro centro del subsector privado, ambos con servicios de Medicina Transfusional con tradición de colaboración y trabajo con otros centros, lo que permitió generar una red de colaboración multidisciplinaria para el análisis de gestantes y sus recién nacidos.

El desarrollo del estudio se llevó adelante con el consentimiento de las pacientes y respetando los requisitos establecidos por el Comité de Ética del Hospital de Clínicas. El protocolo de investigación fue presentado y aprobado con el número de resolución N.º 68/20 y registrado ante el Ministerio de Salud Pública con el N.º 800740.

Se trató de un estudio realizado en dos centros asistenciales del país, prospectivo, descriptivo, de cohorte única de pacientes. Estos centros fueron el Hospital de Clínicas Dr. Manuel Quintela de la Facultad de Medicina, UdelaR, y la Médica Uruguaya Corporación de Asistencia Médica (MUCAM), Uruguay.

Durante el período comprendido entre noviembre de 2020 y marzo de 2023 se incorporaron las gestantes RhD negativas, totalizando 92 pacientes RhD negativas, con embarazos de feto único. A cada paciente se le extrajo una muestra de sangre periférica entre las semanas 17 y 28 de gestación para la genotipificación RHD fetal, empleando un kit nacional de detección molecular del gen de interés.

Todas ellas presentaron un estudio previo de anticuerpos irregulares negativo, es decir, un estatus de no aloinmunización para el antígeno D a la fecha de toma de la muestra para la extracción de ADN y posterior estudio del gen RHD por PCR en tiempo real. El estudio incluyó pacientes usuarias de ASSE, del Hospital de Clínicas y de MUCAM.

Extracción de la muestra

Las muestras recogidas para el presente estudio fueron de sangre entera con EDTA y separadas a 3.000 rpm durante 15 minutos. El plasma obtenido fue almacenado a -20 °C hasta su procesamiento.

La extracción de ADN fetal libre en plasma materno se realizó en el Laboratorio de Patología Clínica, área de Biología Molecular del Hospital de Clínicas, utilizando el equipo QIASymphony en conjunto con el kit Midikit de QIAGEN®. Para obtener una concentración óptima de ADN fetal y de acuerdo con las recomendaciones del fabricante del kit de PCR, se realizó una extracción de ADN a partir de 1,0 mL de plasma. El mismo fue eluido en un volumen final de 60 µL, de los cuales 25 µL fueron utilizados como molde para la PCR.

Dada la baja concentración de ADN fetal circulante en la sangre de las madres embarazadas, se reforzaron las medidas de protección durante la manipulación de la muestra para evitar la ocurrencia de falsos positivos por contaminación del operador. Estas medidas incluyeron el uso de doble guante, sobretúnica de un único uso por encima de la túnica, tapabocas y doble cofia, así como el trabajo dentro de una cabina de PCR. La extracción automatizada constituyó además una medida de protección de la muestra al disminuir los riesgos de contaminación.

Como control en cada ensayo, se incluyó el procesamiento de un plasma RhD negativo, proveniente del Banco de Sangre del Hospital de Clínicas para este ensayo. Se esperó que este control no presentara amplificación para ninguno de los tres exones en estudio, aunque sí se esperó la amplificación del control interno.

Real-time PCR

Para el presente trabajo se utilizó un kit de desarrollo nacional de ATGen SRL (#6067 Kit RHD Fetal Real TM) diseñado para la detección de RHD fetal. Este reactivo se basa en la amplificación de ácidos nucleicos por *real-time* PCR en formato multiplex con sondas TaqMan®, que permiten amplificar tres regiones diferentes del gen que codifica para la proteína D. Estas tres regiones se corresponden con los exones 5, 7 y 10. Este kit aún no se encuentra disponible para su comercialización.

De acuerdo con las condiciones establecidas por el kit, se trabajó con un volumen total de reacción de 50 µL (25 µL de mezcla de reacción y 25 µL de muestra ADN). Cada muestra se incluyó por duplicado. Se utilizó el equipo de PCR *real-time* Bio-Rad CFX96.

Las condiciones de ciclado fueron las indicadas en el inserto del kit:

- Desnaturalización: 95 °C 15 minutos.

Luego, 45 ciclos de:

- 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 30 segundos*

*Adquisición en FAM (exón 5), JOE (exón 7), ROX (exón 10) y Cy5 (control interno).

Análisis estadístico

De acuerdo con los lineamientos detallados en las instrucciones de uso (IDK) del kit de detección molecular mediante PCR en tiempo real, una muestra puede ser categorizada como positiva cuando los tres exones son positivos, es decir, presentan amplificación típica con un Ct<35.

A los efectos de realizar el análisis estadístico que permita evaluar la sensibilidad y la especificidad del método utilizado, los resultados de la genotipificación fetal de RhD, tras el análisis de los exones, se expresaron como variables categóricas (positivo o negativo). De igual forma, la presencia o no del antígeno D en sangre de cordón del recién nacido también se expresó como variable categórica (positivo o negativo).

De forma adicional, para conocer el impacto que ejerce la amplificación de cada uno de los exones en los parámetros evaluados, se construyeron curvas ROC con los valores de Ct obtenidos para cada una de las muestras (utilizando el programa GraphPad Prism, versión 6.01).

Resultados

En total, se recolectaron 92 muestras que se procesaron según el siguiente flujograma (**Figura 1**). Por

lo tanto, 87 muestras fueron incluidas en el presente análisis.

Evaluación de la sensibilidad y especificidad diagnóstica

De las 87 muestras analizadas, 57 fueron RHD positivas tanto por el método de referencia (determinación serológica del antígeno RhD en sangre de cordón postnacimiento) como por el kit de detección molecular empleado.

A su vez, de la interpretación de los resultados obtenidos con el kit de detección molecular se observó que las 57 muestras presentaron amplificación típica para las tres regiones evaluadas, con valores Cts concordantes entre ellos y cumpliendo con los criterios de adecuación definidos en el inserto.

Todas las muestras negativas para el gen RHD fetal (n=30), fueron negativas para los 3 exones que incluye el kit y se confirmó el estatus de negativas mediante determinación serológica del antígeno RhD en sangre de cordón postnacimiento.

En todas las corridas de amplificación obtenidas en el proceso de validación, no se registraron desvíos en cuanto a los valores obtenidos en los controles internos, según los criterios de aceptación definidos en el inserto. Dos ejemplos de dichas corridas se muestran en la **Figura 2**, correspondientes a un feto RHD positivo y un feto RHD negativo. En la **Figura 2a** se observan los 3 exones que a partir de 30 ciclos muestran su amplificación, lo cual no ocurre en la

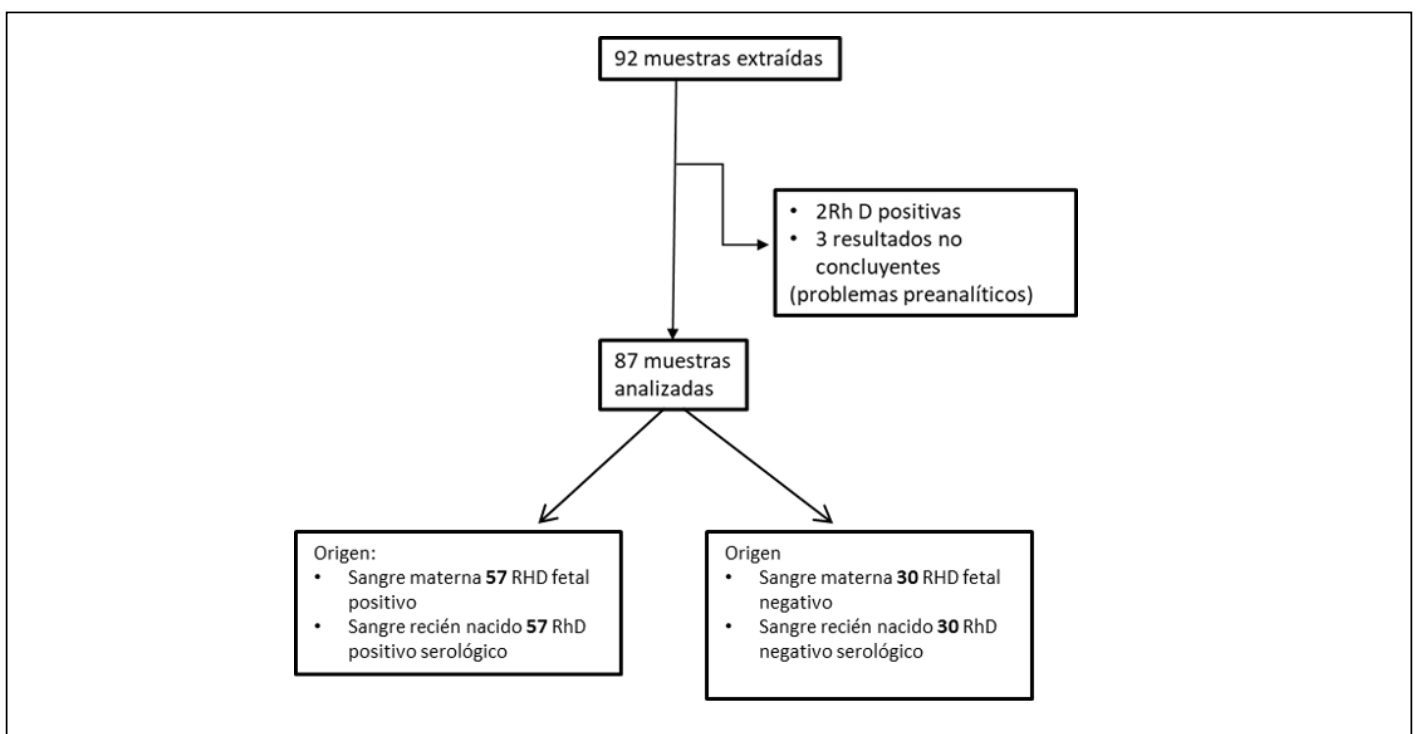


Figura 1. Flujograma de muestras analizadas.

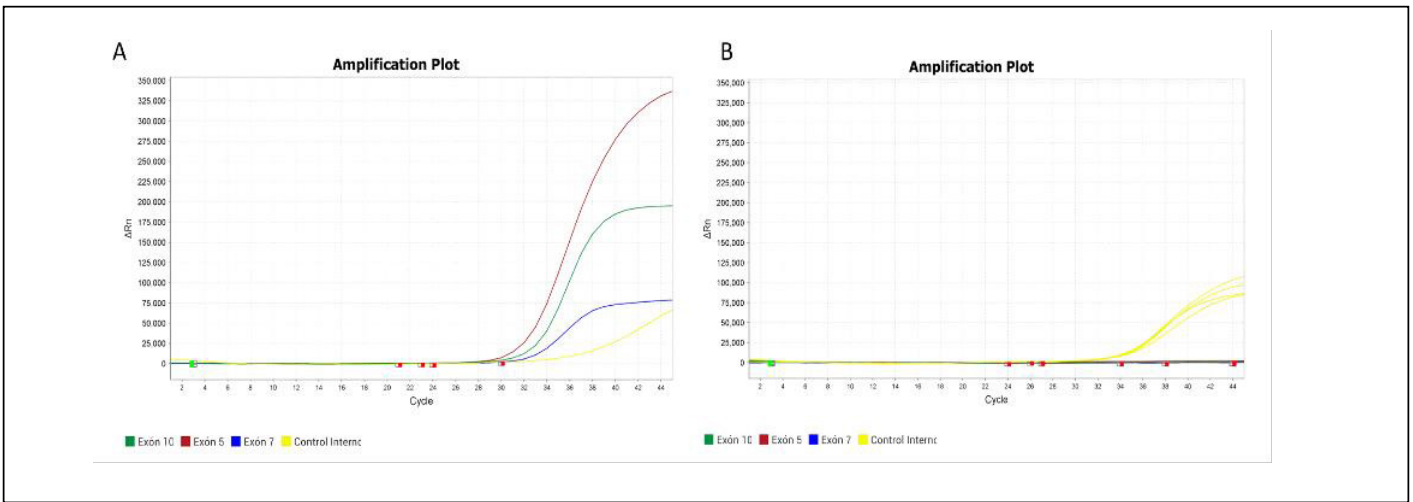


Figura 2. Comportamiento de una muestra fetal RHD positiva (a) y una muestra RhD negativa (b), analizadas para los tres fragmentos amplificados y control interno.

Figura 2b, en la cual solamente amplifica el control interno (amarillo).

Dicho control interno se agrega durante la extracción y permite asegurar que la extracción de ADN transcurrió sin problema y a su vez que la PCR funcionó sin inconvenientes. Se trata de un fragmento de ADN de secuencia conocida, diseñado por los desarrolladores. En condiciones de muestras negativas, de acuerdo a lo que está definido en el inserto, el control interno debe amplificar con un Ct < 35. En condiciones de muestras positivas, el control interno puede presentar una amplificación posterior al punto de corte debido a la competencia por los reactivos a favor de los objetivos del gen RHD. Este comportamiento no invalida el ensayo.

En la **Tabla 1** se muestra la referencia entre los fluoróforos y los exones utilizados. En la **Tabla 2** se resumen

Tabla 1. Criterios de adecuación del kit: detalle referente a la configuración de cada fluoróforo y el fragmento que representa.

| | |
|-----|-----------------|
| FAM | Exon 5 |
| JOE | Exon 7 |
| ROX | Exon 10 |
| cy5 | Control interno |

Tabla 2. Resumen de los resultados de la comparación de las muestras según su estatus con el método de referencia.

| Kit para detección de RhD real TM PCR | | | Grupo RhD posnacimiento por serología | |
|---------------------------------------|--------|---------|---------------------------------------|--------------|
| Exón 5 | Exón 7 | Exón 10 | RhD Negativo | RhD positivo |
| 57 | 57 | 57 | 30 | 57 |

los resultados de las corridas de PCR de ADN fetal y los resultados del grupo RhD obtenidos por serología al nacimiento.

Luego de la evaluación del desempeño del kit de detección molecular en comparación con la metodología de referencia, se observó concordancia perfecta entre los resultados obtenidos con ambas metodologías, sin la ocurrencia de falsos positivos ni de falsos negativos.

En total, para el presente análisis se consideraron 87 muestras procesadas, de las cuales 57 fueron positivas para el gen RhD y 30 fueron negativas.

Se observó una sensibilidad del 100% (IC95%: 93,7–100) y una especificidad del 100% (IC95%: 88,4–100) luego de la aplicación del modelo de Clopper-Pearson. (**Tabla 3**)

Se observó una excelente correlación en la evaluación de la capacidad discriminante de cada exón a través de sus valores de Ct y los resultados obtenidos con el método de referencia. La construcción de curvas ROC para cada uno de los exones mostró un AUC de 1,0. (**Figura 3**)

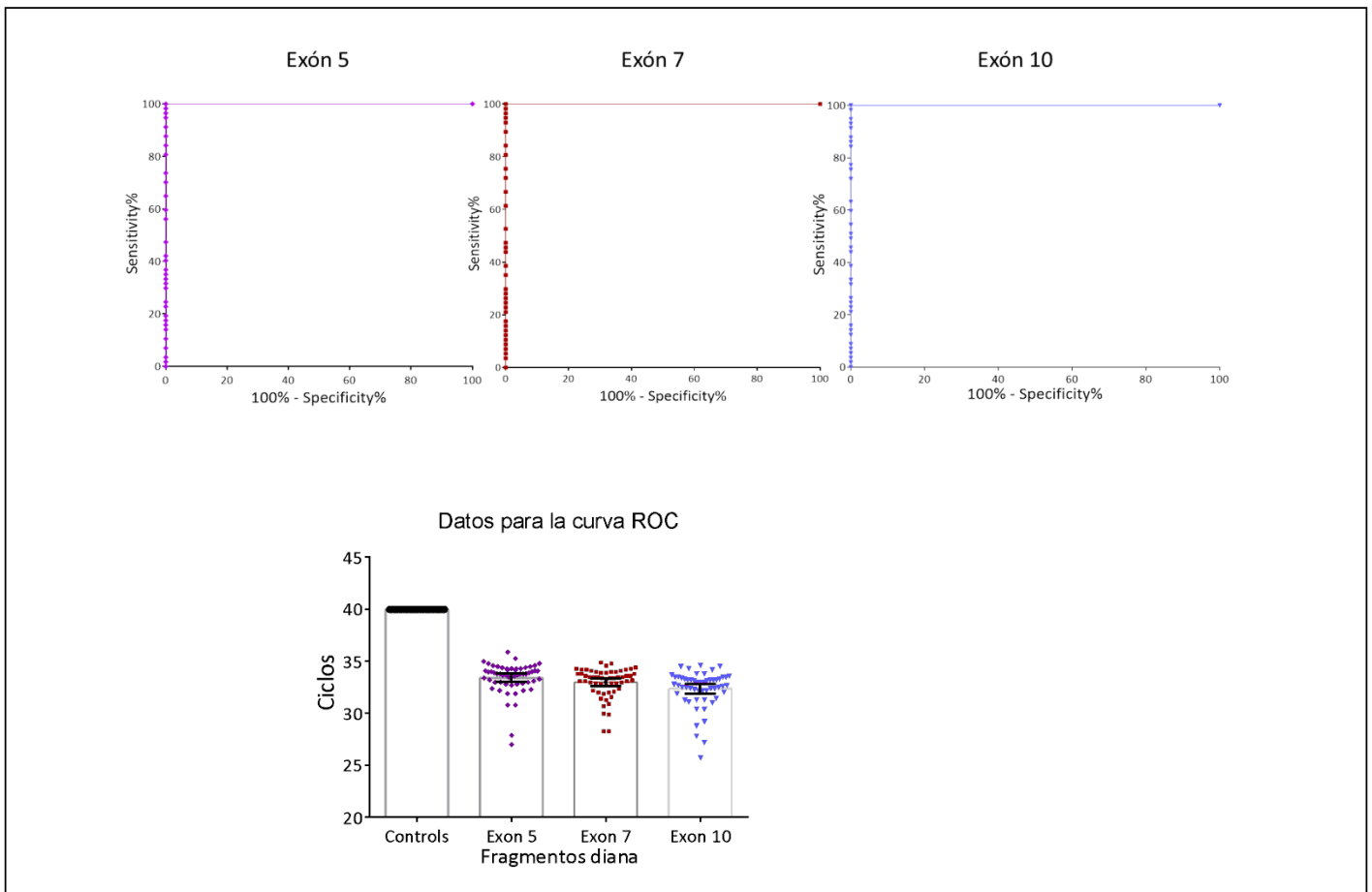
Discusión y conclusiones

El presente trabajo se llevó adelante durante el período comprendido entre noviembre de 2020 y marzo de 2023. Si bien, con fines estadísticos y para alcanzar

Tabla 3. Análisis de sensibilidad y especificidad clínica*.

| Para un IC de 95% | | |
|------------------------------|--------------------|--------------------|
| | Exón 5 | Exón 7 |
| Sensibilidad clínica | 100% (93,73%-100%) | 100% (93,73%-100%) |
| Especificidad clínica | 100% (88,43%-100%) | 100% (88,43%-100%) |

*Para el análisis se consideró un intervalo de confianza de 95%.

**Figura 3.** Análisis de sensibilidad y especificidad.

una precisión del $\pm 5\%$, hubiera sido conveniente la inclusión de un mayor número de muestras, la cantidad de muestras utilizadas fue la disponible durante el período de estudio y permitió estimar la sensibilidad y la especificidad (100% en ambos casos). Dado que el tamaño muestral fue sensiblemente inferior al esperado, consideramos que la construcción de las curvas ROC para evaluar la capacidad categorizante de cada exón aporta evidencia de relevancia sobre el desempeño del kit, reforzando la excelente capacidad diagnóstica observada.

La mayoría de los tratamientos médicos están diseñados para el "paciente promedio", como un enfoque único que puede ser exitoso para algunos pacientes, pero no para otros. La medicina de precisión o "medicina personalizada" es un enfoque innovador para

adaptar la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades, teniendo en cuenta las diferencias en los genes, el entorno y los estilos de vida de las personas. El objetivo de la medicina de precisión es dirigir los tratamientos apropiados a los pacientes adecuados en el momento oportuno. Los avances en este campo ya han dado lugar a diagnósticos y tratamientos que se adaptan a características específicas de los individuos, como su genética, lo que mejora las posibilidades de supervivencia y reduce la exposición a efectos adversos²⁰. En este sentido, el estudio aquí presentado constituye un claro ejemplo de avance hacia una medicina más personalizada. El interés en la capacidad diagnóstica del test radica en la individualización de las características específicas de cada paciente para la aplicación de terapias de mayor precisión.

La evidencia que presentamos demuestra que, para la población analizada, existe una concordancia del 100% en las muestras analizadas entre el genotipo RHD fetal mediante el kit de detección molecular utilizado y la determinación del antígeno D en sangre de cordón mediante las técnicas serológicas estándar (método de referencia).

En varios países del mundo, hace más de una década¹⁸⁻²¹, se utiliza esta herramienta de genotipificación fetal en sangre materna, incluso en el primer trimestre de gestación, para decidir la inmunoprofilaxis anti-D. Esta estrategia garantiza un mejor uso racional de la aloinmunización anti-D en beneficio de la madre y los futuros recién nacidos, disminuyendo el riesgo de enfermedad hemolítica fetoneonatal por el antígeno D. En nuestro trabajo se determinó una sensibilidad y especificidad del kit diagnóstico de detección molecular del 100% cuando fue comparado con el método de referencia.

Cabe destacar que el test de detección molecular utilizado en el presente trabajo es un desarrollo nacional, a cargo de los autores de este trabajo. El mismo se desarrolló como una PCR *in-house* para uso interno en el laboratorio y se encuentra en proceso de desarrollo productivo, en base a los resultados obtenidos.

El proyecto se llevó adelante en embarazos únicos; sin embargo, consideramos que esta técnica diagnóstica es extrapolable a embarazos gemelares, como se aplica en los países ya citados, donde se utiliza esta estrategia. Del total de pacientes evaluadas, encontramos que un 65,5% (n=57) eran portadoras de un feto Rh D positivo y un 34,5% (n=30) eran portadoras de un feto Rh D negativo. Este resultado nos muestra que hay un 34,5 % de las pacientes en las que se realiza un uso inapropiado del recurso. Comparado con los registros de SIP en el Hospital de Clínicas de 2008 y 2018, en los que se evaluaron estas mismas variables, continuamos teniendo el mismo comportamiento poblacional de aproximadamente un 30 % de fetos RhD negativos. De este modo, se han generado erogaciones innecesarias desde la implementación obligatoria de la administración de IgG anti-D antenatal en 2011.

Consideramos que, con la evidencia actual y luego del registro ante los organismos pertinentes del Ministerio de Salud Pública, podría incorporarse a las recomendaciones y normativas vigentes desde 2011 para control de las gestantes RhD negativas la realización del genotipado fetal RHD a partir de la semana 17, evitando así la inmunoprofilaxis anti-D innecesaria en un grupo considerable de pacientes, siendo este un estudio actualmente costo-efectivo en relación a la utilización y disponibilidad en el mundo de hemoderivados^{20,22}.

La implementación de la determinación del estatus para el gen RHD fetal en sangre materna, que reduciría la administración de inmunoprofilaxis anti-D, también pone en evidencia controles innecesarios, como la repetición de estudios inmunohematológicos (por ejemplo, la investigación de anticuerpos irregulares a lo largo del embarazo).

Otro aspecto relevante es el diagnóstico preciso del grupo sanguíneo fetal derivado del estudio de su genotipo, en un tiempo de la gestación que permite la toma de decisiones más apropiada para la gestante y sus futuros embarazos.

A modo de analizar el posible impacto en caso de implementar la genotipificación en las embarazadas en Uruguay, país que en el año 2021 registró 46.000 gestaciones, de las cuales el 15% de las gestantes fueron RhD negativas, se administraron 6.900 dosis de inmunoprofilaxis prenatal a las 28 semanas de gestación, sin conocer el estatus del genotipo fetal. Si a esto agregamos otras indicaciones, como genitorragias de la gestación, placentas previas o maniobras invasivas diagnósticas, el uso de profilaxis se incrementa en 1,5 veces (dato tomado del sistema informático del Banco de Sangre del Hospital de Clínicas). Por lo tanto, el número de dosis administradas no requeridas ascendería a 10.350. De estas, el 34 % corresponden a fetos RhD negativos, lo que da como resultado unas 3.500 dosis administradas de forma innecesaria.

Si analizamos el impacto económico, puede considerarse que, con un valor promedio actual en nuestro mercado de licitación público/privado de US\$ 5.707,5 por dosis, un ahorro de 3.500 dosis representa aproximadamente US\$ 529.804. Teniendo en cuenta que el test diagnóstico de genotipificación, una vez comercializado, tendría un costo aproximado de US\$ 70/determinación, para los 6.900 casos de gestantes RhD negativo, se invertirán US\$ 483.000, permitiendo un diagnóstico de mayor exactitud. A esto debe agregarse la implementación de una medicina dirigida, adaptada a las necesidades del paciente, y la optimización de un recurso finito como lo es un hemoderivado obtenido del plasma humano, actualmente escaso a nivel mundial.

Aunque se ha cuestionado la costoefectividad de la genotipificación fetal del gen RHD antes del nacimiento^{21,22}, existe evidencia creciente que muestra sus beneficios tanto en términos de salud como a nivel económico^{23,24}. Asimismo, se ha reportado que el ahorro más eficiente podría estar en el seguimiento de aloinmunizadas anti-D²¹, aspecto que, si bien no fue analizado en el presente trabajo, representa un componente a revisar en el futuro, y que podría evidenciar un ahorro adicional en gastos sanitarios, que se sumaría al aquí analizado.

A través de este ejemplo se evidencia que la herramienta utilizada para la genotipificación del RHD fetal, es costo-efectiva, permitiendo incluso una ligera disminución de los costos económicos, tomando en cuenta solamente la inmunoprofilaxis, sin analizar otros costos en salud como son la investigación de anticuerpos irregulares, el traslado de la paciente, el incumplimiento o el requerimiento eventual de otros estudios adicionales y de seguimiento, como pueden ser los imagenológicos (seguimiento ecográfico de anemia fetal mediante pico flujo de la arteria cerebral media).

Adicionalmente, el trabajo llevado adelante se basó en el desarrollo de un estudio colaborativo entre centros, contribuyendo a la mejora del conocimiento con una aplicación directa en el área clínica, y dando relevancia al enfoque académico desarrollado, mediante un trabajo interinstitucional e interdisciplinario que fortaleció a los equipos asistenciales involucrados, a los recursos humanos en formación y permitió obtener resultados más precisos en beneficio de nuestros pacientes.

Dado que, según la normativa actual, se administra una dosis de IgG anti-D de 120 microgramos por vía intravenosa en el período prenatal entre las 28 y 32 semanas de gestación y otra dosis postnatal en el caso de los recién nacidos RhD positivos, la adopción de esta estrategia permitiría un ahorro del 34% de la inmunoprofilaxis anti-D.

En este sentido, existen diversas experiencias, especialmente en países desarrollados como el Reino Unido y España, donde se ha implementado esta técnica, incluyéndola desde el primer trimestre de la gestación, con buenos resultados, evitando así la administración innecesaria de inmunoglobulina anti-D²³.

Con base en la evidencia surgida en los últimos años, en las recomendaciones internacionales y en los resultados a partir del desarrollo de este trabajo, este equipo de investigación se encuentra en condiciones de recomendar que la genotipificación fetal RHD sea incorporada a la normativa de seguimiento de la embarazada, a los efectos de que las gestantes accedan a la herramienta disponible actualmente en nuestro país, con el costo-beneficio analizado. Avanzar en este camino, propendiendo prácticas que beneficien a los pacientes y sean costoefectivas, permitirá ampliar los beneficios en salud aquí analizados a otros países de la región latinoamericana.

Agradecimientos

A la Médica Uruguaya Corporación de Asistencia Médica, en especial al Servicio de Hemoterapia, a su Jefe de Servicio, Dr. Wilson Franca, así como a los médicos y técnicos hemoterapeutas que colaboraron: Dra. Carolina Arias, Dr. Regis Gai, Dra. María José

Vespa, Dr. Gabriel Pizzolon, Dra. Elizabeth Sosa, Dra. Verónica Pasos, Dr. Fabián Estavillo, Dr. Alejandro Roland, Dra. Jimena Bentos, TT Andrea Rodríguez y al TT Coordinador Juan Bolsa, y al trabajo realizado por el laboratorio de inmunohematología, a cargo de las técnicas transfusionistas Mariana López, Valeria González y Andrea Muriguenes. Agradecemos también al Prosecretario de la institución, Dr. José Carlos Fagnoni, por las gestiones institucionales, y al Dr. Joaquín Ferreira, del Hospital de Clínicas, por la logística de traslado que permitió contar con las muestras estudiadas.

Financiación

No se recibió financiación para la investigación, autoría y/o publicación de este artículo.

Conflicto de intereses

Los autores J. A. Abin, P. Moerzinger, V. Bengochea y S. Dietrich, al momento de realizar el presente trabajo, formaban parte del equipo de ATGen, empresa responsable de desarrollar el kit de detección del genotipo fetal RHD en sangre materna por PCR en tiempo real. Su participación en el trabajo incluyó el desarrollo del kit, así como el análisis y la discusión de los resultados. El conflicto de interés potencial es de naturaleza profesional-empresarial. Los restantes integrantes del equipo declaran no presentar conflicto de intereses.

Contribución de autoría

Gabriela Rivas: concepción, diseño, ejecución, redacción, revisión crítica.

Virginia Marcalain: concepción, diseño, ejecución, redacción, revisión crítica.

Hany Pérez: diseño, ejecución, redacción, revisión crítica.

Luciano Fernández: diseño, ejecución, redacción, revisión crítica.

Daniela Saliwonzcyk: concepción, diseño, ejecución, redacción, revisión crítica.

Valentina Silveira: concepción, diseño, ejecución, redacción, revisión crítica.

Juan Recouso: concepción, diseño, ejecución.

Juan Abin: concepción, diseño, ejecución, redacción, revisión crítica.

Patricia Moerzinger: concepción, diseño, ejecución, redacción, revisión crítica.

Virginia Bengochea: concepción, diseño, ejecución, redacción, revisión crítica.

Sofia Dietrich: concepción, diseño, ejecución, redacción, revisión crítica.

Pablo López: concepción, diseño, ejecución.

Vania Medina: concepción, diseño, ejecución.

Francisco Coppola: concepción, revisión crítica.

Fernanda Blasina: concepción, diseño, redacción, revisión crítica.

Ismael Rodríguez: concepción, revisión crítica.

Declaraciones éticas

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Clínicas, mediante la resolución n.º 68/20, y registrado ante el Ministerio de Salud Pública con el n.º 800740. En consecuencia, cumple con las normativas éticas nacionales e internacionales aplicables a investigaciones con seres humanos. Asimismo, para la realización de este estudio, se obtuvo el consentimiento informado expreso de las pacientes para su publicación, de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Para garantizar la confidencialidad, los datos fueron estrictamente anonimizados, conforme a la legislación vigente de protección de datos.

Uso de inteligencia artificial

No se utilizaron herramientas de inteligencia artificial en la redacción, análisis, interpretación o revisión de este artículo.

Disponibilidad de datos

El conjunto de datos que respalda los resultados de este estudio no se encuentra disponible.

Aprobado por el Consejo Editorial de la Revista Médica del Uruguay

Referencias

1. Guía de manejo obstétrico y recién nacido en madre aloimmunizada. *Rev Med Urug.* 2021;37(3). Disponible en: <http://doi.org/10.29193/rmu.37.3.15>
2. Ree IMC, Smits-Wintjens VEJ, Van Der Bom JG, Van Klink JMM, Oepkes D, Lopriore E. Neonatal management and outcome in alloimmune hemolytic disease. *Expert Rev Hematol* 2017; 10(7):607-16. Disponible en: <http://doi.org/10.1080/17474086.2017.1331124>
3. Alonso JG, Decaro J, Marrero A, Lavalle E, Martell M, Cuadro JC. Repeated direct fetal intravascular high-dose immunoglobulin therapy for the treatment of Rh hemolytic disease. *J Perinat Med* 1994; 22(5):415-9. Disponible en: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/jpme.1994.22.5.415/html>
4. American Association of Blood Banks. Manual técnico. 17.ª ed. Editado por la Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunohematología. Argentina: AAHI; [Internet]. Disponible en: <https://booksmédicos.org/manual-tecnico-aabb-17a-edicion/>
5. Cuadro JC, Decaro J, Scasso JC, Gutiérrez C, Alonso JG, Varela S, et al. Normas para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad hemolítica por conflicto Rh. Montevideo: DELTA; 1981.
6. Crowther CA, Middleton P, McBain RD. Anti-D administration in pregnancy for preventing Rhesus alloimmunisation. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; (2):CD000020. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD000020.pub2>
7. Decaro J. Enfermedad hemolítica perinatal (EHP). Rimarco; 2003.
8. National Institute for Clinical Excellence. Technology appraisal guidance 41: guidance on the use of routine antenatal anti-D prophylaxis for RhD-negative women. London: NICE; 2002.
9. Scasso JC, Decaro J, Cuadro JC, Lieutier G, Alonso JG, Varela S. Enfermedad hemolítica perinatal por aloimmunización Rh (D). Montevideo: Ediciones de la Plaza; 1983.
10. Ministerio de Salud Pública. Guías en salud sexual y reproductiva: manual para la atención a la mujer en el proceso de embarazo, parto y puerperio [Internet]. Montevideo: MSP; 2014. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-desarrollo-social/comunicacion/publicaciones/guias-salud-sexual-reproductiva-manual-para-atencion-mujer-proceso>
11. Ministerio de Salud Pública. Recomendaciones para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad hemolítica feto-neonatal en la gestación e inmunoprofilaxis anti-D [Internet]. Montevideo: MSP; 2011. Ordenanza ministerial N.º 99/2011. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/sites/ministerio-salud-publica/files/2018-09/Ordenanza%20MSP%2099-2011%20Prevencion%20Enfermedad%20Hemolitica%20Perinatal.pdf>
12. Sørensen K, Kjeldsen-Kragh J, Husby H, Akkøk ÇA. Determination of fetal RhD type in plasma of RhD negative pregnant women. *Scand J Clin Lab Invest* 4 de 2018; 78(5):411-6. Disponible en: <http://doi.org/10.1080/00365513.2018.1475681>
13. McBain RD, Crowther CA, Middleton P. Anti-D administration in pregnancy for preventing Rhesus alloimmunisation. *Cochrane Database Syst Rev* 2015; 2015(9):CD000020. Disponible en: <http://doi.org/10.1002/14651858.CD000020.pub3>
14. Qureshi H, Massey E, Kirwan D, Davies T, Robson S, White J, et al. BCSH guideline for the use of anti-D immunoglobulin for the prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn: Guidelines. *Transfus Med* 2014; 24(1):8-20. Disponible en: <http://doi.org/10.1111/tme.12091>
15. Clausen FB, Damkjær MB, Dziegiel MH. Noninvasive fetal RhD genotyping. *Transfus Apher Sci* 2014; 50(2):154-62. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.transci.2014.02.008>
16. 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. Disponible en: <http://doi.org/10.1046/j.1537-2995.2002.00165.x>
17. Webb J, Delaney M. Red blood cell alloimmunization in the pregnant patient. *Transfus Med Rev* 2018; 32(4):213-9. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.tmr.2018.07.002>
18. Clausen FB, Jakobsen TR, Rieneck K, Krog GR, Nielsen LK, Tabor A, et al. Pre-Analytical Conditions in Non-Invasive Prenatal Testing of Cell-Free Fetal RHD. Boenig H, editor. *PLoS ONE* 2013; 8(10):e76990. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076990>
19. Schmidt LC, Cabral ACV, Faria MA, Monken F, Tarazona-Santos E, Martins ML. Noninvasive fetal RHD genotyping from maternal plasma in an admixed Brazilian population. *Genet Mol Res* 2014; 13(1):799-805. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4238/2014.February.7.1>
20. Saramago P, Yang H, Llewellyn A, Palmer S, Simmonds M, Griffin S. High-throughput, non-invasive prenatal testing for fetal Rhesus D genotype to guide antenatal prophylaxis with anti-D immunoglobulin: a cost-effectiveness analysis. *BJOG Int J Obstet Gynaecol* 2018; 125(11):1414-22. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/1471-0528.15259>
21. Gajic-Veljanoski O, Li C, Schaink AK, Guo J, Higgins C, Shehata N, et al. Noninvasive fetal RhD blood group genotyping: A systematic review of economic evaluations. *J Obstet Gynaecol Can* 2021; 43(12):1416-1425.e5. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.jogc.2021.07.014>

22. Ontario Health (Quality). Noninvasive fetal RhD blood group genotyping: a health technology assessment. Ontario Health Technology Assessment Series [Internet]. 2020; 20(15):1–160. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7670296/>
23. Neovius M, Tiblad E, Westgren M, Kublickas M, Neovius K, Wikman A. Cost-effectiveness of first trimester non-invasive fetal RHD screening for targeted antenatal anti-D prophylaxis in RhD-negative pregnant women: a model-based analysis. *BJOG* 2016; 123(8):1337-46. Disponible en: <http://doi.org/10.1111/1471-0528.13801>
24. Gajic-Veljanoski O, Li C, Schaink AK, Guo J, Shehata N, Charames GS, et al. Cost-effectiveness of noninvasive fetal RhD blood group genotyping in nonalloimmunized and alloimmunized pregnancies. *Transfusion* 2022; 62(5):1089-102. Disponible en: <http://doi.org/10.1111/trf.16826>

Non-invasive fetal RHD genotyping in maternal plasma: Towards improved maternal and child care in Uruguay

Abstract

The Uruguayan regulation requires serological RhD determination for all maternal-neonatal dyads. Fetal RHD genotyping in maternal blood, performed with a nationally developed kit, allows for the identification of same-group maternal-fetal dyads, which could potentially prevent anti-D immunoglobulin prophylaxis.

This was a prospective, descriptive, single-cohort, multicenter study of 92 RhD-negative, non-alloimmunized pregnant women with a single-fetus pregnancy. A peripheral blood sample was collected between weeks 17 and 28 of gestation. An ATGen Laboratory kit was used via real-time multiplex PCR with TaqMan probes, allowing for simultaneous and differential amplification of three regions of the RHD gene (exons 5, 7 and 10). The results were compared with serological RhD determination in neonatal cord blood.

Out of 92 samples, 5 were discarded (2 from RhD-positive mothers and 3 with pre-analytical issues). Fifty-seven samples were positive for the three evaluated exons, with concordant Ct values and meeting the adequacy criteria defined in the insert ($Ct \leq 37$). For these 57 maternal samples, their neonate was positive via post-birth serological RhD antigen testing. The samples negative for the fetal RHD gene ($n=30$) were negative for the 3 exons of the kit, and it was confirmed that the RhD antigen in the cord blood was negative. The nationally produced molecular kit identified the three fetal exons in maternal plasma with 100% sensitivity and specificity, incorporating this new technology in Uruguay.

Keywords: Rhesus system (RHD). Anti-D immunoprophylaxis. Fetal genotype–maternal blood. RhD-negative pregnant women. Real-time PCR–RHD gene.

Genotipagem fetal RHD não invasiva em plasma materno: rumo a uma melhor atenção materno-infantil no Uruguai

Resumo

A normativa uruguaia exige a determinação sorológica do RhD em toda a díade materno-neonatal. A genotipagem do gene RHD fetal em sangue materno, realizada com um kit de desenvolvimento nacional, permite identificar díades materno-fetais com o mesmo grupo RhD, o que poderia evitar a profilaxia com imunoglobulina anti-D.

Tratou-se de um estudo multicêntrico, prospectivo, descritivo, de coorte única, incluindo 92 gestantes RhD negativas, não aloimunizadas, com gestações de feto único. Foi coletada uma amostra de sangue periférico entre as semanas 17 e 28 de gestação. Utilizou-se o kit de detecção molecular do gene RHD do Laboratório ATGen, que consiste em uma PCR em tempo real em formato multiplex com sondas TaqMan, permitindo a amplificação simultânea e diferencial de três regiões do gene RHD (éxons 5, 7 e 10). Os resultados foram comparados com a determinação sorológica do RhD em sangue de cordão umbilical neonatal (método de referência).

Das 92 amostras, 5 foram excluídas por não atenderem aos critérios de inclusão do presente estudo (2 correspondentes a mães RhD positivas e 3 devido a problemas pré-analíticos). Cinquenta e sete amostras foram positivas para os três éxons avaliados, com valores de Ct concordantes e atendendo aos critérios de adequação definidos no inserto do kit ($Ct \leq 37$). Nessas 57 amostras maternas, o neonato apresentou sorologia positiva para o antígeno RhD no período pós-natal. As amostras negativas para o gene RHD fetal ($n = 30$) foram negativas para os três éxons do kit, e confirmou-se que, no sangue de cordão umbilical, o antígeno RhD era negativo. O kit molecular de produção nacional identificou os três éxons fetais no plasma materno, com sensibilidade e especificidade de 100%, incorporando essa nova tecnologia no Uruguai.

Palavras-chave: Sistema Rhesus–RHD. Imunoprofilaxia anti-D. Genótipo fetal–sangue materno. Gestantes RhD negativas. PCR em tempo real–gene RHD.