



SETS

Sociedad Española de Transfusión Sanguínea y Terapia Celular

PROTOCOLO DE DIAGNÓSTICO Y PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD HEMOLÍTICA DEL FETO Y DEL RECIÉN NACIDO. (Marzo 2008)

Sociedad Española de Transfusión Sanguínea

- Dr. Eduardo Muñoz-Díaz. Banc de Sang i Teixits. Barcelona
- Dr. Salvador Oyonarte. Centro de Transfusión de Granada-Almería
- Dra. Julia Rodríguez-Villanueva. Servicio de Transfusión. Hospital Provincial. CHOP. Pontevedra.

Sociedad Española de Obstetricia y Ginecología

- Dr. Juan Parra. Servicio de Ginecología Obstetricia. Hospital de Sant Pau. Barcelona.
- Dr. Juan Carlos Santiago. Servicio de Ginecología y Obstetricia. USP. Hospital de Marbella.

PROTOCOLO DE DIAGNÓSTICO Y PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD HEMOLÍTICA DEL FETO Y DEL RECIÉN NACIDO. (Marzo 2008)

Definición

La EHFRN o eritroblastosis fetal (EBF), habitualmente producida por los anticuerpos de especificidad anti-Rh(D), se origina como consecuencia de la destrucción de los hematíes fetales inducida por la acción de aloanticuerpos IgG específicos derivados de la madre que atraviesan la placenta, y que reaccionan con un antígeno de origen paterno presente sobre los hematíes del feto y ausente de los eritrocitos maternos. La enfermedad comienza en la vida intrauterina afectando al feto y, más tarde, al recién nacido (RN). La gravedad de la enfermedad puede oscilar desde anomalías hematológicas detectables únicamente mediante pruebas de laboratorio hasta la muerte fetal intraútero.

Incidencia

Hace 50 años fallecían en Inglaterra y Gales unos 1000 neonatos/año afectos de esta enfermedad, lo que suponía una incidencia de 150 muertes por cada 1000.000 de nacimientos. A principios de los años 40, en Manitoba (Canadá), un 10% de las muertes perinatales se producían por EHFRN y la incidencia de éxitus entre los neonatos afectados por la enfermedad era de un 40%. Las mejoras introducidas en los cuidados obstétricos y neonatales permitieron reducir en 10 veces la incidencia de éxitus, fundamentalmente con la introducción de la exsanguinotransfusión, el parto prematuro y, finalmente, con la transfusión intrauterina.

En los países occidentales, entre 1968 y 1994, la prevalencia descendió desde el 4-5/1000 a 0,5-1/1000 RN vivos. Por ej. en París hubo 85.000 nacidos vivos en 1994, y 75 casos de EHFRN, lo que da una incidencia de 0,9/1000 nacidos vivos. La incorporación de la administración de gammaglobulina anti-D (IgG anti-D) para la prevención de la aloinmunización en las gestantes Rh(D) negativo fue el factor determinante de este descenso en la prevalencia de la enfermedad. En el Reino Unido la incidencia de aloinmunización materna se sitúa en un 1-1,5% debido, principalmente, a fallos en la administración de IgG anti-D, a hemorragia transplacentar antepartum o a hemorragia importante durante el parto.

Incompatibilidad Rh (D)

Se presenta cuando la madre es Rh (D) negativo y el padre Rh (D) positivo, lo cual sucede en nuestro medio en, aproximadamente, el 12% de las parejas. El problema se produce cuando el feto hereda el carácter Rh (D) positivo, lo cual ocurrirá en el 100% de las parejas si el padre es homocigoto para el antígeno Rh(D) (D/D), y sólo en el 50% si el padre es heterocigoto (D/-). Aproximadamente el 40% de los individuos Rh(D) positivo son heterocigotos.

Sensibilización Rh (D)

Es el proceso por el cual la madre desarrolla anticuerpos anti-Rh(D) en respuesta al antígeno Rh(D) presente en el feto. Aunque en el 90% de los casos, el antígeno Rh(D) es el responsable de la incompatibilidad feto-materna, también otros antígenos del sistema Rh pueden originar este problema (antígeno c, mayoritariamente), así como antígenos pertenecientes a otros sistemas del grupo sanguíneo (Kell, Fy^a, Jk^a).

Las causas de la sensibilización materna pueden ser entre otras: la hemorragia transplacentaria fetomaterna, la transfusión de componentes sanguíneos y los trasplantes de órganos y tejidos. En el caso de la mujer gestante, este proceso puede haber ocurrido antes del embarazo, o durante el embarazo, y puede ser capaz de desencadenar la EHFRN o Eritroblastosis Fetal.

Patogenia de la EHFRN

La causa fundamental de la EHFRN es la reacción entre el anticuerpo materno de clase IgG y el antígeno presente en los hematíes fetales que trae como consecuencia la destrucción de los mismos, principalmente en el bazo.

Salvo que la madre haya estado sensibilizada previamente por transfusiones, es muy raro que la EHFRN se produzca en el curso del primer embarazo (0,4 a 2% de todos los casos). Habitualmente, en el curso de la primera gestación tiene lugar la sensibilización materna primaria, caracterizada por la producción de una escasa cantidad de anticuerpos de tipo IgM, inmunoglobulinas que no atraviesan la placenta. En sucesivos embarazos, y tras una nueva exposición al antígeno, se producirán anticuerpos de clase IgG como resultado de una sensibilización anamnésica o secundaria, y estos anticuerpos, por su naturaleza IgG, atravesarán la barrera placentaria y acabarán ocasionando hemólisis. La respuesta inmune dependerá básicamente de: la inmunogenicidad del antígeno, del volumen y número de eventos inmunizantes, de la capacidad de respuesta del receptor y de que se haya o no efectuado la profilaxis con IgG anti-D. La incompatibilidad ABO entre madre y feto, protege parcialmente de la inmunización.

En un 20-25% de los casos la enfermedad se presentará en su forma más grave (hidrops fetal y muerte), y en un 50% de los mismos ello ocurrirá antes de la semana 34. En un 25%, los fetos sufren una hemólisis menos intensa, pero pueden desarrollar kernicterus si no son tratados correctamente al nacer. En el 50% restante de los casos, los fetos nacen sólo levemente afectados y se recuperan sin tratamiento.

La experiencia nos ha demostrado la buena tolerancia que los fetos manifiestan ante situaciones de anemia, incluso muy grave, por lo que el objetivo básico del tratamiento fetal consistirá en emplear la transfusión intrauterina de hematíes exclusivamente en los casos en que es previsible la evolución a hidrops antes de las 32-34 semanas de gestación, y en la adecuada planificación de la finalización de la gestación cuando se rebese dicho período.

Diagnóstico de aloinmunización y protocolo de control de las gestantes sensibilizadas

En toda gestante, sea Rh(D) positivo o negativo, se deben realizar las siguientes pruebas analíticas coincidiendo con la primera visita al obstetra, y siempre dentro del **primer trimestre**:

- Grupo ABO y Rh (D)
- Escrutinio anticuerpos eritrocitarios irregulares (EAI), también denominado Coombs indirecto en referencia a la técnica empleada.

Si el resultado del EAI es positivo se procederá a investigar la especificidad del anticuerpo. En el **Anexo 1** se exponen una serie de recomendaciones en torno a las determinaciones analíticas de las gestantes.

1. Protocolo en gestantes no sensibilizadas (EAI negativo).

1.1. Gestante Rh(D) positivo.

Debe repetirse el EAI en el último trimestre (**24-34 semanas**), pues cabe la posibilidad de que se haya producido una aloimmunización en el curso de la gestación, especialmente si han intervenido circunstancias favorecedoras de una hemorragia feto-materna: maniobras obstétricas, traumatismo abdominal o transfusión de componentes sanguíneos.

1.2. Gestante Rh(D) negativo.

Se recomienda realizar, como mínimo, un nuevo control de EAI **antes de las 28 semanas** de gestación, para valorar la indicación de administrar IgG anti-D (**Anexo 2**). Si el nuevo EAI resulta de nuevo negativo se deberá de administrar la dosis preceptiva de IgG anti-D; por el contrario, si el nuevo EAI demuestra la presencia de un anticuerpo anti-Rh(D) no estará indicada la administración de IgG anti-D.

2. Protocolo en gestantes sensibilizadas (EAI positivo).

Toda gestante Rh (D) negativo o positivo, sensibilizada por un anticuerpo, requiere una valoración y un seguimiento especial, tanto desde el punto de vista inmunohematológico como obstétrico. En el caso de antecedentes obstétricos y/o en presencia de anticuerpos capaces de provocar una EHFRN, es necesario enviar a la gestante a un centro especializado, donde el tratamiento de la madre y el niño pueda realizarse adecuadamente. En este punto puede ser necesaria la realización, simultánea o progresiva, de diferentes estudios complementarios que ayudarán a predecir la magnitud potencial del problema generado por la incompatibilidad materno-fetal:

- Titulación y/o cuantificación del anticuerpo materno
- Estudio del fenotipo del padre para determinar la zigosidad del antígeno (Ag) problema y la probabilidad de que el feto herede, o no, este antígeno (**Anexo 3**).
- Análisis del genotipo Rh(D) fetal para confirmar la incompatibilidad (**Anexo 4**).
- Pruebas para valorar o predecir el grado de afectación fetal (**Anexo 5**).

Algunos de estos estudios pueden realizarse en el centro de origen, pero otros de carácter más complejo sólo están al alcance de laboratorios de inmunohematología de referencia.

Los **Acs de clase IgM** no requieren un seguimiento especial y, por tanto, no están indicados los estudios complementarios. La gestante puede continuar con el protocolo que le corresponda de acuerdo con su grupo Rh(D) (**apartados 1.1 y 1.2**).

Los **Acs de clase IgG** y, muy especialmente los de especificidad anti-Rh(D), van a exigir estudios complementarios para poder precisar, en la medida de lo posible, qué gestantes y/o qué fetos van a ser subsidiarios de estudios o exploraciones más complejas incluyendo las de carácter invasivo.

La **Titulación del anticuerpo** continúa siendo la técnica más sencilla y al alcance de cualquier laboratorio para valorar la evolución del Ac materno. Para que el título tenga valor debe ser realizado bajo las mismas condiciones técnicas, por el mismo personal siempre que sea factible y examinando en paralelo la muestra actual con la precedente. Se entiende por **Título crítico** aquél que una vez alcanzado puede asociarse a afectación fetal y que, por ello, puede justificar exploraciones de carácter invasivo (cordocentesis) que nos permitan valorar más objetivamente el grado de anemización fetal. El título crítico ha ido cambiando con el tiempo y, en la actualidad, se considera que muy raramente habrá afectación fetal mientras el título se mantiene por debajo de 128.

Hay que tener una especial consideración por los aumentos súbitos de título entre 2 determinaciones sucesivas, de manera que un incremento de título en dos diluciones puede ser una alarma indicativa de progresión de la inmunización materna y de previsible afectación fetal.

La técnica de ELAT (Enzyme-Like Antiglobulin Technique), es una técnica alternativa a la titulación que permite cuantificar la cantidad de Ac materno. El título de 128 es equivalente a 15U/ml, y por debajo de este valor tampoco suele haber afectación fetal.

2.1. Mientras el título se mantiene por debajo de 128 (15 U/ml), se debe de investigar el fenotipo del padre y/o de determinar el grupo Rh(D) fetal si ya se han superado las 12 semanas de gestación. El objetivo es confirmar la existencia de una incompatibilidad materno-fetal antes de que el título alcance un nivel crítico. Habrá que poner en marcha un programa de seguimiento específico de las gestantes sensibilizadas que incluya las determinaciones seriadas del título de anticuerpo y las exploraciones obstétricas complementarias (Anexo 6).

El título se realizará cada 4 semanas hasta la semana 28 y quincenalmente después de esta semana y, en general, coincidiendo con la consulta de valoración obstétrica.

Si el título se ha mantenido estable y por debajo de 128, la gestante podrá ser asistida en un parto espontáneo.

El control obstétrico de valoración de la afectación fetal (CV) habitualmente incluirá:

- Ecografía para detectar signos indirectos de anemia fetal y signos precoces de hidrops,
- Doppler con determinación del pico sistólico de velocidad en la arteria cerebral media (PSV-ACM).

No obstante, la intervención activa del obstetra raramente será necesaria antes de las 20 semanas de gestación, salvo en los casos excepcionales de gestantes altamente sensibilizadas y con antecedentes de haber inducido EHFRN grave.

2.2. Si el título es igual o superior a 128 (15 U/ml) o se produce un aumento rápido del mismo respecto a la titulación precedente (>2 diluciones), se recomienda repetir las determinaciones seriadas cada 2 semanas, y la consulta de valoración obstétrica cada 1-2 semanas a partir de las 20 semanas de gestación.

Se finalizará la gestación alrededor de las 34-36 semanas dado que en esta fase final es cuando existe mayor riesgo de agravamiento de inmunización materna y de afectación fetal.

Si antes de las 32 semanas, el título crítico se acompaña de ascitis o de otros signos indirectos ecográficos de anemia, y el Doppler muestra un PSV-ACM > 1,5 MoM, se realizará una cordocentesis para valorar objetivamente el grado de anemización fetal y de una eventual transfusión. Después de las 32 semanas se planificará la extracción fetal en un entorno adecuado de acuerdo con el equipo perinatal.

El estudio de la actividad lítica de un anticuerpo (**Anexo 5**) puede resultar especialmente útil en aquellas situaciones en las que habiendo alcanzado o superado el título crítico no se detectan signos obstétricos indirectos de afectación fetal. El objetivo es disponer de la mayor información posible para valorar la conveniencia, o no, de realizar una cordocentesis y establecer la periodicidad adecuada de los controles.

2.3. En los casos de antecedentes mayores (hidrops, muerte intraútero o muerte perinatal) en los que la hemólisis pueda iniciarse antes de las 18 semanas de gestación, se realizará un tratamiento materno con gammaglobulinas intravenosas a partir de la 14 semanas combinado con plasmaféresis (Anexo 7).

Se finalizará cuando ya sea factible la cordocentesis y la posibilidad de realizar una transfusión intraútero (TIU), a partir de las 18-20 semanas.

La última transfusión se realizará antes de las 32 semanas para permitir la extracción fetal hacia las 34 semanas.

Anexo 1. Observaciones en torno a las determinaciones analíticas de tipaje ABO/Rh(D) y de escrutinio e identificación de anticuerpos irregulares.

Identificación de las muestras

Las solicitudes y las muestras de las gestantes deben estar correctamente identificadas incluyendo los requisitos siguientes: Apellidos y nombre, fecha de nacimiento y número unívoco de identificación.

El laboratorio debe de conocer los antecedentes clínicos, transfusionales y obstétricos de la gestante.

Tipaje Rh(D)

Se recomienda emplear un reactivo monoclonal (IgM) que no reconozca a las variantes DVI.

Las muestras se examinarán por duplicado, a menos que se emplee un equipo automatizado con transferencia electrónica de los resultados.

El test directo de la antiglobulina no debe utilizarse en las muestras de gestantes que son o aparentan ser Rh(D) negativo.

Si la aglutinación obtenida no se corresponde con la que habitualmente presentan las muestras Rh(D) positivo, se recomienda catalogar la muestra de forma provisional como Rh(D) negativo, hasta que un laboratorio de referencia determine definitivamente el carácter positivo o negativo de la misma.

Los profesionales implicados en el programa profiláctico antenatal deben de informar a la gestante de que es portadora de un grupo Rh(D) negativo y, como tal, candidata al tratamiento con IgG antiD de acuerdo con el calendario previsto. También se recomienda que estos profesionales dispongan de "Guías de uso de IgG anti-D" en las que se establezcan de forma clara las indicaciones, dosis y vías de administración de la misma. Finalmente, es aconsejable que se provea a las candidatas a recibir profilaxis de un carnet o ficha que indique de modo evidente su grupo sanguíneo Rh(D) negativo.

Escrutinio e identificación de Acs irregulares

La técnica de la antiglobulina indirecta (Coombs indirecto) con incubación a 37°C es la técnica de elección para el escrutinio e investigación de Acs irregulares antieritrocitarios.

El escrutinio de Acs irregulares con hematíes tratados enzimáticamente no aporta ningún valor adicional.

La titulación anti-A y/o anti-B no es necesaria porque no permite predecir la EHFRN por incompatibilidad ABO materno-fetal.

En los hematíes empleados para el escrutinio de Acs irregulares (EAI) deben estar representados los siguientes antígenos: C,c,D,E,e,K,k,Fya, Fyb, Jka, Jkb, S,s,M,N,Lea.

Es recomendable que una célula de escrutinio sea R1R1 y otra R2R2 y que los antígenos Fya, Fyb, Jka, Jkb, S y s estén presentes en forma homocigota en una de las células.

No deben efectuarse mezclas de diferentes hematíes para su empleo en el EAI.

No es imprescindible que los antígenos Cw, Kp^a y Lu^a estén presentes en las células de escrutinio.

Titulación

La titulación de los anticuerpos de especificidad anti-Rh(D) se debe realizar preferentemente con células R2R2. Por el contrario, las restantes especificidades deben titularse con hematíes heterocigotos

Anti-D pasivo *versus* anti-D inmune

Cuando la gestante ha recibido IgG antiD, el anti-D pasivo va a ser detectado en el EAI. En estos casos no va a ser posible diferenciar el anti-D pasivo de un anti-D inmune. La vida media del anti-D pasivo es de aproximadamente 3 semanas, pero su presencia puede ser detectada, dependiendo de la sensibilidad de la técnica, hasta 3 o más meses después.

Si se demuestra que la gestante ha recibido IgG antiD en las 8 semanas precedentes, y el anticuerpo es débil, se aconseja mantener el calendario de profilaxis.

Si no hay evidencia de administración de IgG antiD en las semanas previas, se aconseja monitorizar el anticuerpo cada 4 semanas hasta la semana 28, y cada 15 días después de la semana 28:

- Si el anticuerpo se va debilitando progresivamente e, incluso, desaparece, cabe pensar que se trata de un anticuerpo pasivo.
- Por el contrario, si el título se mantiene o incrementa hay que pensar en un anticuerpo de origen inmune.
- Si siguen existiendo dudas respecto a la naturaleza del anticuerpo se recomienda mantener el programa de profilaxis antenatal.

Anti-D+C *versus* anti-G

Una proporción de las muestras con una aparente especificidad anti-D+C, en las que el título de anti-C es claramente superior al de anti-D, pueden corresponder a una especificidad anti-G. Las consecuencias clínicas derivadas de una u otra especificidad son obvias, ya que la gestante portadora de un anti-G sin anti-D debe seguir el programa profiláctico antenatal con IgG antiD, lo que no sería necesario si la presencia de anti-D fuera real.

Estos casos deben ser remitidos a un laboratorio de referencia para discriminar la verdadera especificidad presente en la gestante.

Anti-D débil detectado en autoanalizador

Las gestantes en las que se detecta un anti-D débil en autoanalizador pueden no estar inmunizadas. En un estudio, 206 de 236 gestantes con un anti-D débil detectado en autoanalizador no presentaron progresión de la inmunización, a pesar de ser portadoras de un hijo Rh(D) positivo. Por esta razón, se aconseja que en estos casos se administre la dosis de IgG anti-D postparto.

Anexo 2. Profilaxis de la isoimmunización Rh(D).

Está indicada la administración de IgG anti-D en gestantes Rh (D) negativo, no sensibilizadas, cuya pareja es Rh(D) positivo, o bien cuando se desconoce el grupo Rh(D) de la pareja, en las siguientes situaciones:

1. 300 µgrs dentro de las 72 horas siguientes al parto de un feto Rh (D) positivo.
2. 300 µgrs a las 28 semanas de gestación, si el padre es Rh (D) positivo.
3. Una dosis de 300 µgrs durante la primera mitad del embarazo en todas las mujeres que sufren un aborto espontáneo o inducido, embarazo ectópico o hemorragia vaginal de probable origen uterino.

Durante el primer trimestre una dosis de 50 µgr podría ser suficiente.

En algunos países no se realiza esta administración si se trata de un aborto no complicado o en caso de hemorragia vaginal leve y no dolorosa.

4. Dosis de 300 µgrs en todas las exploraciones que comporten riesgo de hemorragia transplacentaria (HTP): biopsia de corion, amniocentesis, funiculocentesis, versión cefálica externa, traumatismo abdominal, etc.
Durante el primer trimestre una dosis de 50 µgrs sería suficiente.
5. Se recomienda realizar un test de Kleihauer o una técnica equivalente siempre que exista sospecha de una HTP durante la gestación o el postparto (por ejemplo placenta previa o abrupcio placenta) para ajustar la dosis de IgG anti-D, que deberá aumentarse si se detectan más de 30 ml de sangre fetal.

Anexo 3. Determinación del fenotipo paterno y de la zigosidad del antígeno Rh(D).

El interés de conocer el genotipo Rh(D) paterno en la pareja de una gestante Rh(D) negativo reside en que si el padre es homocigoto (DD), todos sus hijos serán Rh(D) positivo y heredarán el riesgo de padecer una EHFRN. Si el padre es heterocigoto (D) habrá un 50% de posibilidades de que cada hijo sea Rh(D) positivo o negativo. Aproximadamente el 40% de los individuos Rh(D) positivo son heterocigotos.

Habitualmente se emplea la determinación del genotipo más probable (g.m.p) de acuerdo con la prevalencia conocida de los diferentes haplotipos RH en la población. Este método está sujeto a errores, especialmente cuando se estudian padres de hijos que han sufrido EHFRN grave, porque la proporción de homocigotos a heterocigotos es superior a la esperada (4/1); sin embargo esta técnica está al alcance de cualquier laboratorio y sigue siendo ampliamente utilizada. Como alternativa al procedimiento clásico y a fin de realizar un consejo genético riguroso existen otras opciones que permiten una aproximación más exacta al grado de zigosidad del antígeno Rh(D) paterno:

- Un ejemplo es la técnica diseñada por Pertl B y col basada en la utilización de una PCR cuantitativa fluorescente. La técnica se basa en la amplificación de un fragmento de DNA del exón 7 de los genes RHD y RHCE y en el análisis del número de copias de cada gen mediante secuenciación automática. Los individuos D/D muestran un ratio 1:1 y los D/- 1:2.
- Wagner FF y Flegel WA y, más tarde, Chiu RW et al diseñaron una PCR que amplifica el "Rhesus Box" híbrido que resulta del entrecruzamiento desigual que tiene lugar entre las 2 "Rhesus Boxes" situadas en las regiones adyacentes al gen *RHD*, y que tiene lugar en el curso de la delección del gen *RHD* en los individuos Rh(D) negativo. Con esta PCR se pueden detectar de forma clara a los individuos heterocigotos, ya que sólo en éstos estará presente el híbrido analizado.

Anexo 4. Análisis del genotipo Rh(D) fetal

Se puede determinar el factor Rh(D) del feto mediante técnicas de amplificación genómica a partir de líquido amniótico y vellosidades coriónicas, durante el primer trimestre, o del plasma de la madre a partir del segundo trimestre (>12 semanas). Esta segunda opción permite un diagnóstico no invasivo, por lo que en caso de feto incompatible, no contribuimos a agravar el cuadro de sensibilización.

1. El análisis del genotipo Rh(D) fetal en líquido amniótico o vellosidad corial durante el primer trimestre, estaría especialmente indicado cuando haya antecedentes graves que nos hagan sospechar hemólisis grave antes de las 18 semanas de gestación y, así, evitar el tratamiento con gammaglobulinas, asociado o no a plasmaféresis, en los casos en que no haya incompatibilidad.

El mayor inconveniente del análisis del genotipo Rh(D) fetal en líquido amniótico o corion radica en el carácter invasivo de la amniocentesis que conlleva un riesgo de aborto de un 0,5%-1%, al que se suma el riesgo de reinmunización materna, aproximadamente de un 17%, por lo que esta determinación analítica sólo está indicada en:

- los excepcionales casos de mujeres altamente sensibilizadas con antecedentes de hidrops o de fetos muertos, en las que se desconoce el genotipo Rh(D) del padre o se sabe que éste es heterocigoto.
- en todas las gestantes Rh(D) negativo en las que por indicación obstétrica o genética se realice una amniocentesis, a fin de evitar estudios inmunohematológicos o exploraciones adicionales innecesarias, así como la injustificada administración de IgG anti-D, si se demuestra que el feto no ha heredado el carácter Rh(D) positivo.

2. La posibilidad de determinar el genotipo Rh(D) fetal a partir de una muestra de plasma materno, ha constituido uno de los retos más atractivos en el ámbito de la profilaxis de la EHRN y del diagnóstico prenatal, en general. Su aplicación ordinaria, carente de los riesgos que conllevan las técnicas invasivas de diagnóstico prenatal, supone la aplicación de un programa profiláctico más racional de la EHFRN.

El DNA fetal en plasma materno se encuentra en una concentración hasta 8 veces superior a la obtenida con la extracción convencional, y la PCR a tiempo real permite cuantificar el producto amplificado con un nivel de sensibilidad tal que es posible la detección del gen RHD a partir de una sola célula fetal. Se recomienda efectuar el estudio a partir del 2º trimestre de la gestación, con la antelación suficiente para poder valorar objetivamente si procede, o no, la administración profiláctica de la dosis de IgG anti-D correspondiente a la semana 28. En la gestante sensibilizada, el análisis nos permitirá confirmar o desmentir la incompatibilidad materno-fetal.

Anexo 5. Pruebas funcionales para predecir el grado de afectación fetal

Algunos de los factores que inciden en la gravedad de la EHRN, más allá de la concentración o del título del anticuerpo materno, pueden ser evaluados utilizando ensayos celulares que miden la capacidad de estos anticuerpos para promover las interacciones entre los hematíes y los monocitos o los linfocitos K.

- La adherencia y fagocitosis de los hematíes por los monocitos son medidas con la técnica conocida como MMA (monocyte monolayer assay) o Actividad fagocítica

mononuclear. La fiabilidad de los resultados parece depender en gran manera de la subclase de inmunoglobulina implicada, y se han descrito falsos positivos asociados a la presencia de anticuerpos que contienen mayoritariamente IgG3.

- La lisis de los hematíes inducida por monocitos o linfocitos K es evaluada con las técnicas de M-ADCC o K-ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity assays with monocytes or K lymphocytes) o Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. Con la técnica de M-ADCC se valora la interacción de los hematíes sensibilizados con anti-D IgG y el receptor Fc γ I; y con la técnica de K-ADCC se valora la interacción con el receptor Fc γ III. Asimismo, con la primera técnica se detectan preferentemente anticuerpos IgG3, y con la técnica de K-ADCC es posible detectar diferencias funcionales entre diferentes anticuerpos monoclonales humanos anti-D IgG1 que son indistinguibles en los ensayos que utilizan monocitos. En Holanda se emplea de manera habitual la técnica de M-ADCC para predecir el grado de afectación fetal.
- La respuesta metabólica de los monocitos en presencia de hematíes sensibilizados se mide con la técnica de CLT (Chemiluminescence) o de **Quimioluminiscencia**. Esta técnica se emplea ordinariamente en el Reino Unido y tiene la ventaja, respecto a las anteriores, de no requerir isótopos radiactivos. Aunque no exenta de errores, la capacidad predictiva de la técnica se ha demostrado superior a la de las anteriormente descritas.

Estas técnicas pueden estar indicadas especialmente en los casos en los que habiendo alcanzado el título crítico de 128 no existen signos indirectos de afectación fetal. Un resultado que muestre ausencia de capacidad lítica en el anticuerpo materno puede servir de apoyo al obstetra para mantener una actitud conservadora y evitar exploraciones invasivas innecesarias en ese momento.

Anexo 6. Control de valoración fetal.

- **Historia de los embarazos previos.** La enfermedad suele agravarse en embarazos sucesivos. Es muy importante valorar y diferenciar el tipo de antecedente: mayor cuando ha habido hidrops, muerte intrauterina (MIU) o muerte en el periodo postnatal (MPN), y menor cuando solo se requirió exanguinotransfusión, transfusión o fototerapia.
- **Ecografía.** Es de gran utilidad. Se valoran signos indirectos de anemia fetal como la presencia de polihidramnios (ILA >19 cm), incremento del perímetro abdominal fetal >2 DS (desviaciones estándar), y aumento del grosor placentario (>49mm a partir del tercer trimestre). *Cuando el feto tiene una anemia grave (hemoglobina por debajo de las 4 DS de la que le correspondería para las semanas de gestación), es casi constante la presencia de alguno de ellos. La aparición de ascitis traduce invariablemente anemia fetal grave inferior a 7 gr/dl.*
- **Doppler.** Se determinará el PSV-ACM. Valores >1,5 MoM se asocian de forma frecuente a anemia grave, mientras que valores inferiores a la mediana la descartan. Dada la existencia de falsos positivos (alrededor del 12%) conviene su valoración conjunta con otros parámetros ecográficos y analíticos.

Tabla con el valor esperado del PSV-ACM (cm/seg) según la edad gestacional. (Tomada de Mari G: *N Engl J Med*, Vol 342 (1). January 6, 2000. 9-14)

<u>SG</u>	<u>Mediana</u>	<u>1,5MoM</u>
18	23,2	34,8
19	25,5	38,2

22	27,9	41,9
24	30,7	46
26	33,6	50,4
28	36,9	55,4
30	40,5	60,7
32	44,4	66,6
34	48,7	73,1
36	53,5	80,2
38	58,7	88
40	64,4	96,6

- **Cordocentesis.** Es el único sistema fiable y exacto para medir el grado de anemia fetal. La técnica tiene un riesgo aproximado de pérdida fetal de un 1,3%, y de hasta un 40% de reinmunización materna que puede agravar la enfermedad. Por ello sólo se indicará su realización cuando por métodos no invasivos se sospecha la necesidad de una transfusión intrauterina: presencia de ascitis u otros signos indirectos ecográficos de anemia y si el Doppler muestra un PSV-ACM >1,5 MoM en un feto de riesgo con un título de anticuerpos ≥ 128 , y si la gestación no ha alcanzado las 32 semanas. En este contexto convendrá tener preparada sangre para iniciar una eventual transfusión.

Anexo 7. Tratamiento materno y transfusión intrauterina.

El objetivo, en los casos de mayor gravedad, es evitar la muerte fetal o la evolución a hidrops antes de alcanzar la madurez, y poder planificar la extracción a partir de las 32 semanas.

1. Tratamiento materno.

- Mediante gammaglobulinas endovenosas y plasmaféresis. La sistemática es realizar dos plasmaféresis de 2000 ml en un intervalo de 48h (días 1 y 3) seguidas de la administración durante dos días consecutivos (días 3 y 4) **de inmunoglobulina endovenosa a dosis de 0,8gr/kg+20gr cada día.**
- Este tratamiento está indicado iniciarlo a las 14 semanas de gestación, como recurso en aquellos casos excepcionales con antecedentes de hidrops de presentación muy precoz, a la espera de poder realizar una cordocentesis y transfusión intraútero a partir de las 18-20 semanas de gestación.

2. Transfusión intrauterina.

- Es el tratamiento de elección cuando se constata una anemia fetal grave antes de las 32 semanas de gestación.

Con una aguja 20G se punciona el cordón umbilical (habitualmente la vena) y se extrae una muestra de sangre fetal que se analizará para grupo ABO y Rh(D), test de Coombs directo y nivel de hemoglobina.

En función de las semanas de gestación, del nivel de hemoglobina fetal y del nivel de hemoglobina de la unidad de sangre (20 gr/dl), podremos calcular el volumen de sangre a transfundir.

Los hematíes a transfundir en la primera ocasión serán de grupo O Rh(D) negativo resuspendidos en plasma AB Rh(D) negativo.

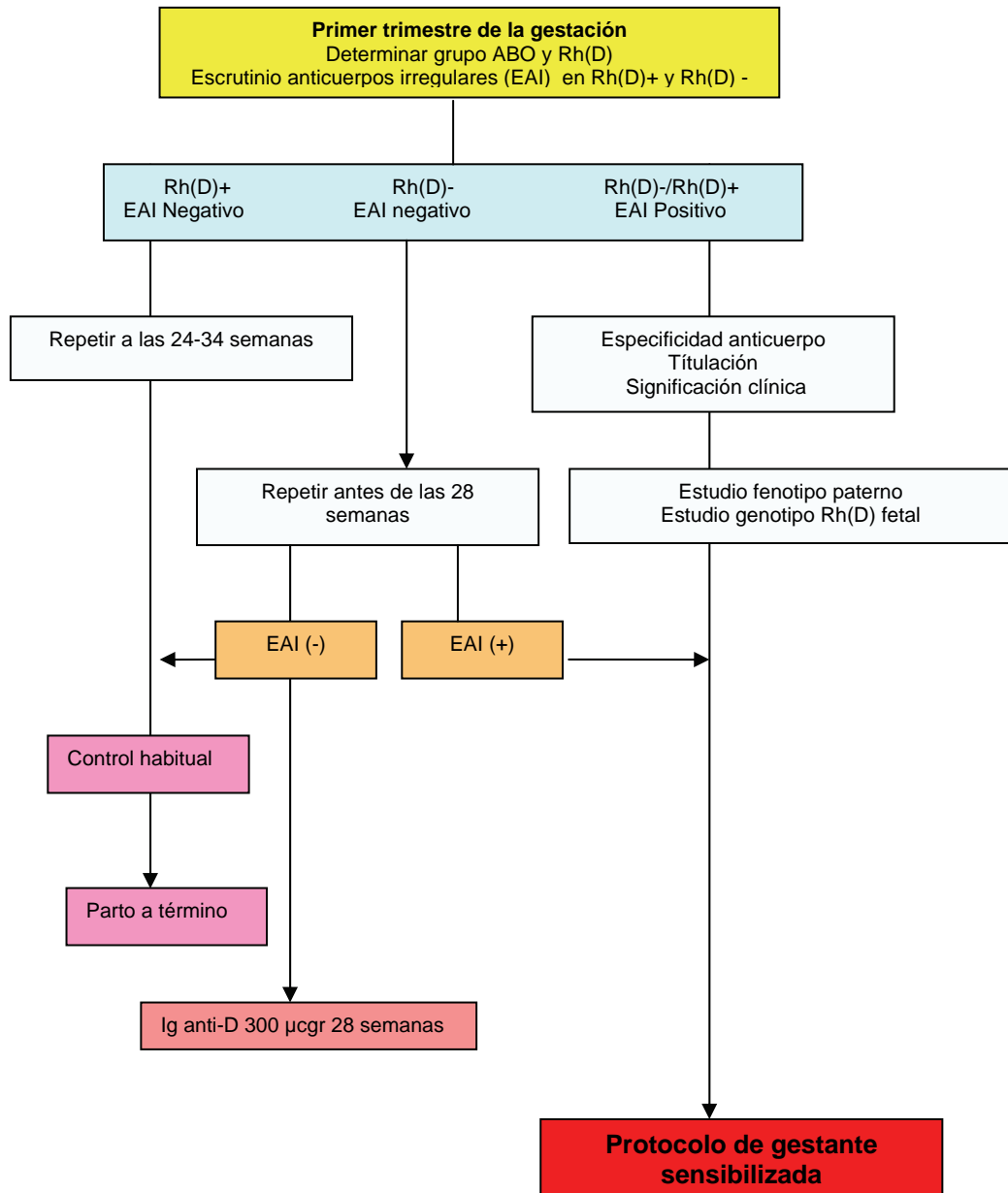
Cuando conozcamos el grupo del feto, se empleará sangre isogrupo ABO con el mismo, siempre que sea compatible con la madre, de menos de 72 horas, leucodeplecionada, e irradiada dentro de las 24 horas anteriores a la transfusión.

- El objetivo es remontar la hemoglobina hasta percentiles normales para la edad gestacional, salvo en fetos hidrópicos, en los que ante el riesgo de desequilibrio hemodinámico, se realizará una elevación de la hemoglobina más gradual. Tras una primera transfusión, se procederá a la segunda en un plazo no superior a dos semanas. Las siguientes transfusiones se indicarán en función del porcentaje de hematíes fetales aún circulantes y de la hemoglobina post-transfusional alcanzada, habitualmente entre 1 y 3 semanas después de la última transfusión. Existen controversias en la actualidad sobre el valor que el Doppler con el PSV-ACM puede tener en la indicación de estas transfusiones sucesivas.

REFERENCIAS

1. Harman C. Ultrasound in the management of the alloimmunized pregnancy. In Fleischer A, Manning F, Jeanty P, Romero R, eds. *Sonography in Obstetrics and Gynecology. Principles and Practice*. Fifth edition. Appleton and Lange. 1966.
2. Nicolaidis KH, Soothill PW, Clewell W, et al. Rh disease: intravascular fetal blood transfusion by cordocentesis. *Fetal Therapy* 1986;1:185.
3. De la Cámara C, Arrieta R, González A et al. High-dose intravenous immunoglobulin as the sole prenatal treatment for severe Rh immunization. *N Engl J Med* 1988; 318:519-520.
4. Parra J, Escartin F, Salameo F. Eritroblastosis fetal. Indicaciones y riesgos de la transfusión fetal. *Experiencia actual. Prog Diag Prenat* 1994. Vol 6 N° 7. 475-480.
5. Huang CH, Reid ME, Chen Y et al. Molecular definition of red cell Rh haplotypes by tightly linked Sph RFLPs. *Am J Hum Genet* 1996; 58:133-142.
6. 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.
7. Muñoz-Díaz E, Arilla M, Parra J et al. Prenatal diagnosis of the Rh D fetal blood type on amniotic fluid. *Br J Obstet Gynaecol* 1998;105:11.
8. Rodeck CH, Deans A. Red cell alloimmunization. En: Rodeck CH, White MJ. Eds. *Fetal Medicine*. London: Churchill Livingstone, 1999:785-804.
9. Mari G, Deter RL, Carpenter RL et al. Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red cell alloimmunization. *New Engl J Med* 2000; 342: 9-14
10. 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):15-23.
11. 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; 195 (6):1550-6
12. Rodríguez-Villanueva J. Prevención de la aloimmunización materna con gammaglobulina anti-D. *Boletín de la SETS* 2007;19(2):4-9.
13. Gooch A, Parker J, Wray J, Querishi H. Guideline for blood grouping and antibody testing in pregnancy. *British Society for Haematology* (2007).

Algoritmo 1. Estudio en todas las gestantes.



Algoritmo 2. Protocolo en la gestante sensibilizada.

