

Estudio de variantes débiles y parciales del antígeno D en donantes de sangre del Centro Metropolitano de Sangre y Tejidos

Carolina Alquinta M.

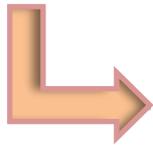
Profesor Guía: TM. Andrés Aburto A.

Santiago, 31 de agosto 2012

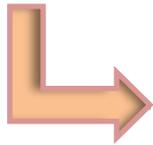


Sistema Sanguíneo Rh

- Es el segundo grupo sanguíneo de importancia clínica.
- Presenta un alto grado de polimorfismo

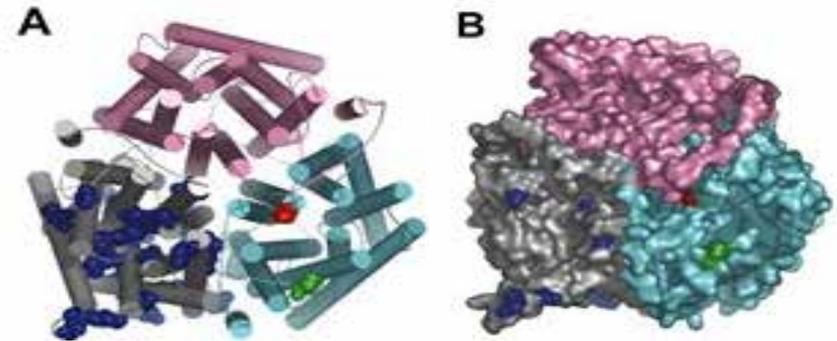
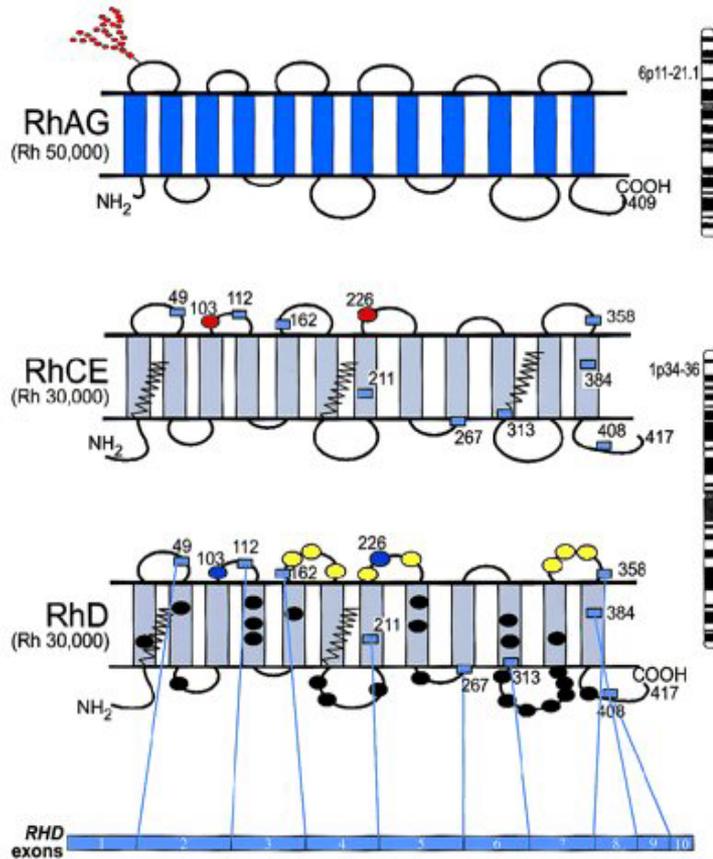


Reacciones Hemolíticas Transfusionales



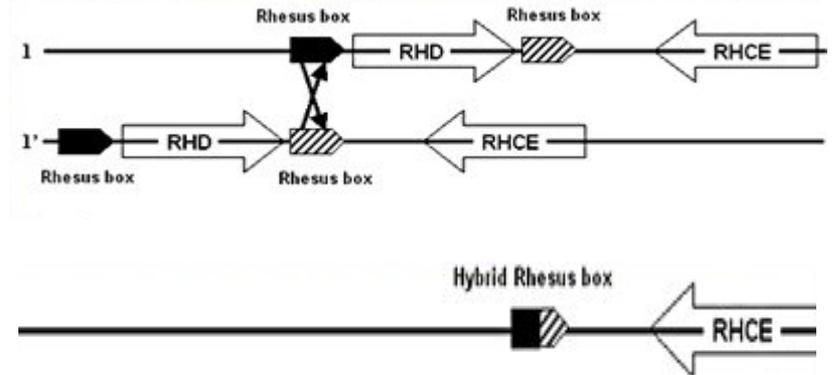
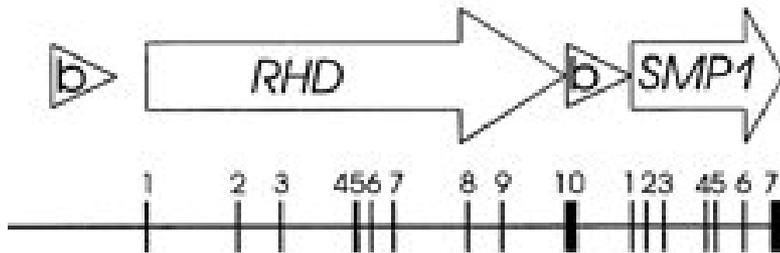
Enfermedad Hemolítica del feto y Recién Nacido



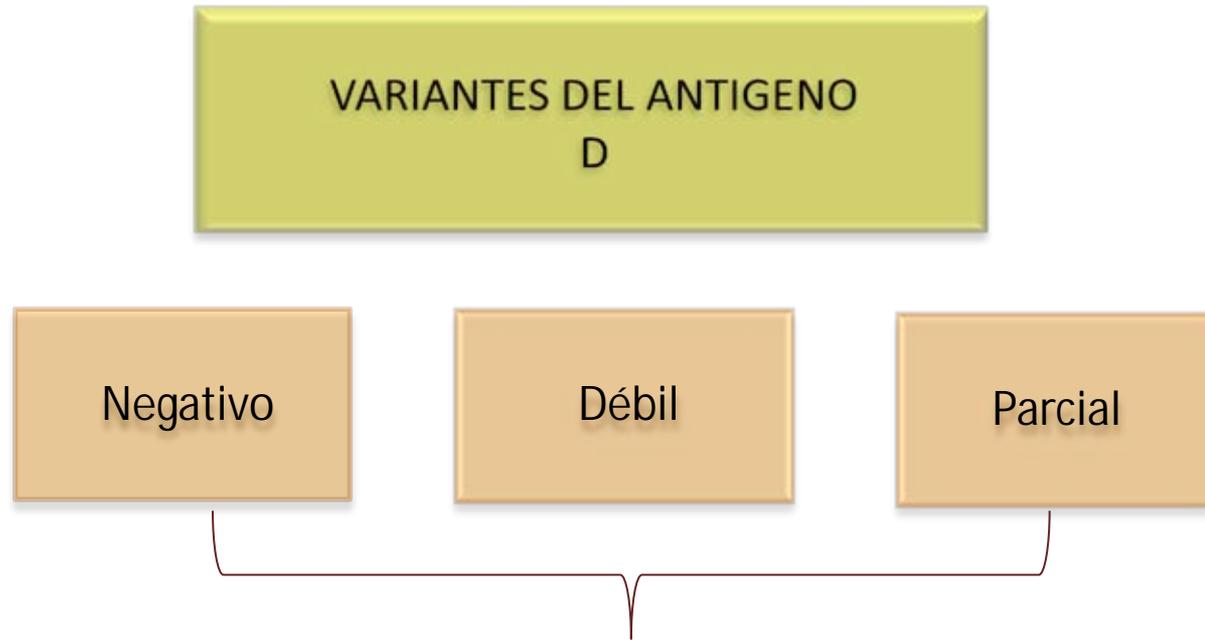


- Altamente homólogos: 96%
- RhAG: Similitud 40%
- Estabilización del complejo proteico en la membrana plasmática con el citoesqueleto
- Tetrámero

Antígeno D

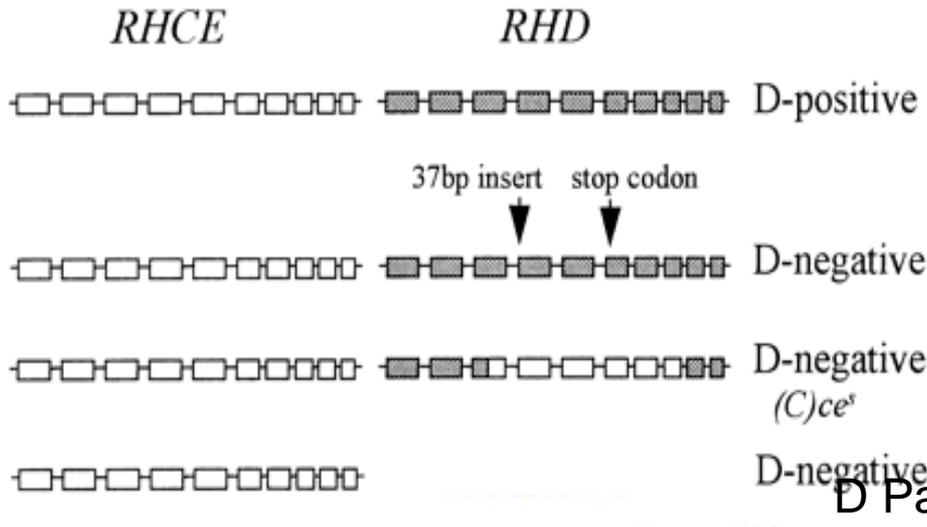


- RHD esta flanqueado por dos segmentos de DNA
- Contiene una región idéntica de 1463 pb, región de ruptura
- Secuencia híbrida llamada caja Rhesus híbrida.

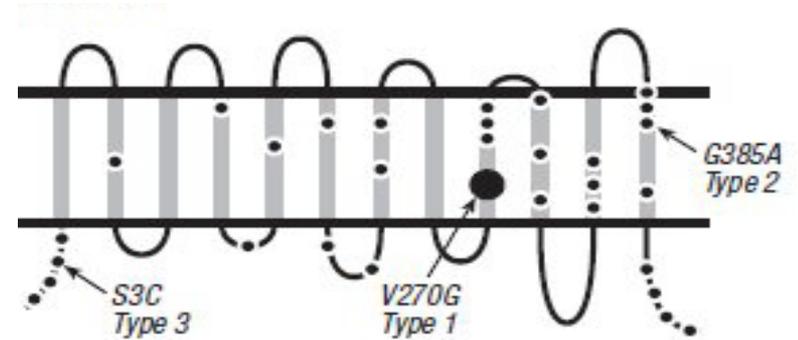


- Reacciones transfusionales por incompatibilidad Rh entre donantes y receptores.
- Incompatibilidad entre embarazadas Rh (-) y su feto Rh (+)

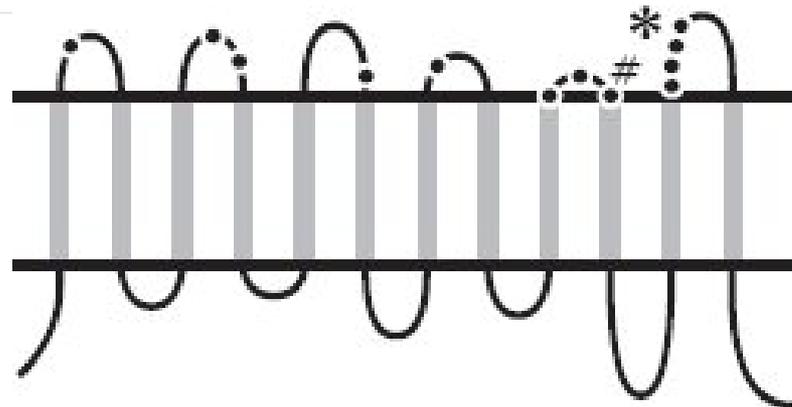
D negativo



D débil



D Parcial



Hipótesis

La identificación de las variantes débiles y parciales del antígeno D, permitirá proponer algoritmos de trabajo y una determinación de referencia que contribuya a esclarecer discrepancias para la tipificación RhD.

- Objetivo general

Determinar las variantes del antígeno D existentes en muestras provenientes del Centro Metropolitano de Sangre y Tejidos que presentan un fenotipo discrepante.

- **Objetivos específicos**

Determinar la presencia de variantes del antígeno D existentes en muestras de sangre del Centro Metropolitano de Sangre y Tejidos, a través de un kit comercial de anticuerpos monoclonales y un kit de PCR-SSP.

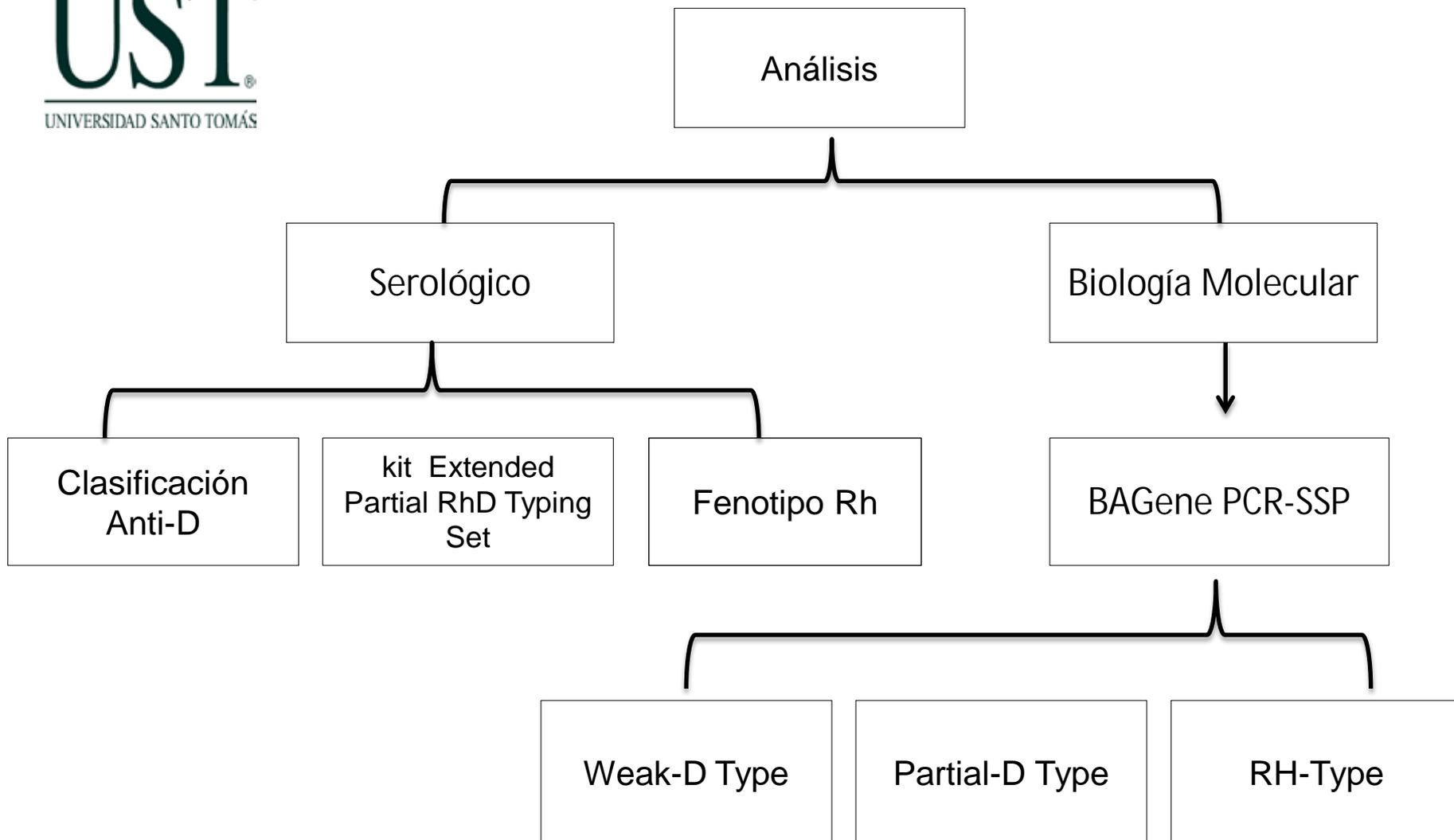
Comparar los resultado de las técnicas utilizadas en el Servicio de Sangre estudiado, en relación a las técnicas propuestas por el Instituto de Salud Pública de Chile.

Establecer algoritmos de detección inmunohematológica que permitan proponer una determinación de referencia para variantes del antígeno D en Chile.

Diseño Experimental

- Consentimiento informado: aprobado por el comité de Ética del Instituto de Salud Pública de Chile y Servicio de Salud Sur Oriente.





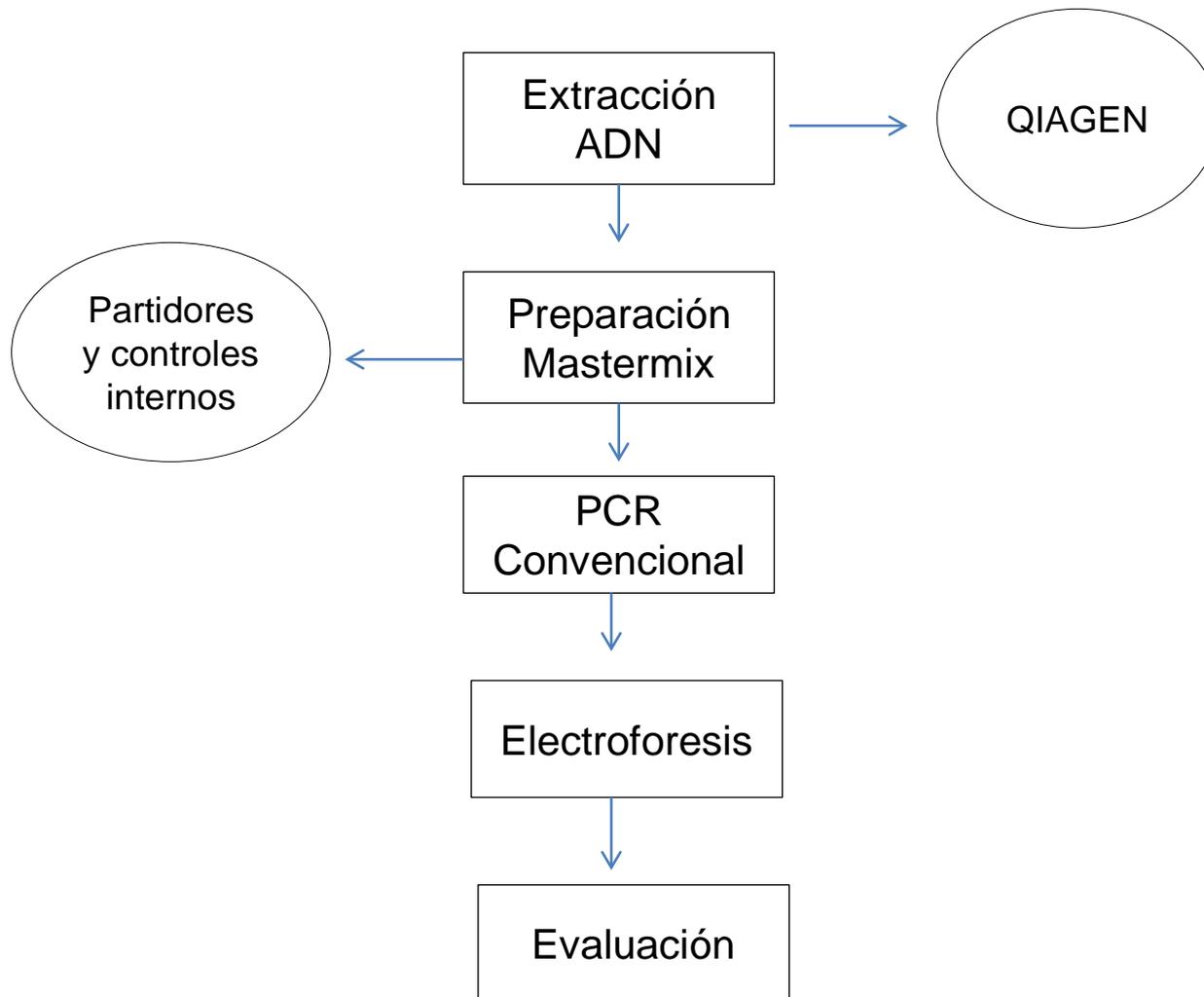
Análisis Serológico

- Clasificación con reactivos anti-D
 - Scott Health Centre IgM - IgM/IgG
 - Grupo BIOS IgM/IgG
 - DiaClone IgM/IgG

- Kits serológico kit Extended Partial RhD Typing Set

Anti-D ALBAclone®	Nr.	DI/ DNU	DIH	DV (1)	DV (2)	DCS	DVI	DVII	DOL	DFR	DAR (3, 5)	DAR-E (3)	DHK/ DAU-4 (4)	DBT	DHAR	Weak D (5, 7)	Weak D type 38 (6)
LHM76/58	1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	weak/ -	+	-
LHM76/59	2	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
LHM174/102	3	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
LHM50/28	4	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
LHM169/81	5	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
ESD1	6	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
LHM76/55	7	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
LHM77/64	8	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
LHM70/45	9	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	weak/ -	-
LHM59/19	10	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
LHM169/80	11	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
LHM57/17	12	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-

Análisis Molecular



Resultados

- Análisis Serológicos

Clasificación Con reactivos Anti-D

	Determinación en Tubo	Determinación en Gel
Reacción positiva débil < 3+	14	13
Reacción negativa	5	6
Total de muestras	19	19

N° de muestras y variantes identificadas por el kit “Extended Partial RhD Typing Set”

Variantes	N° de muestras
DVI	1
DHAR	2
DIII	3
DCS	1
DV	1
D DÉBIL	2
NO DETERMINADOS	4
TOTAL	14

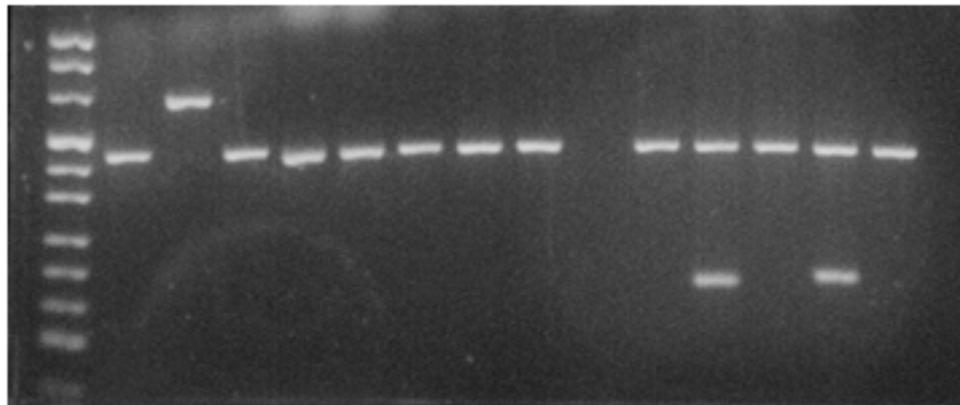
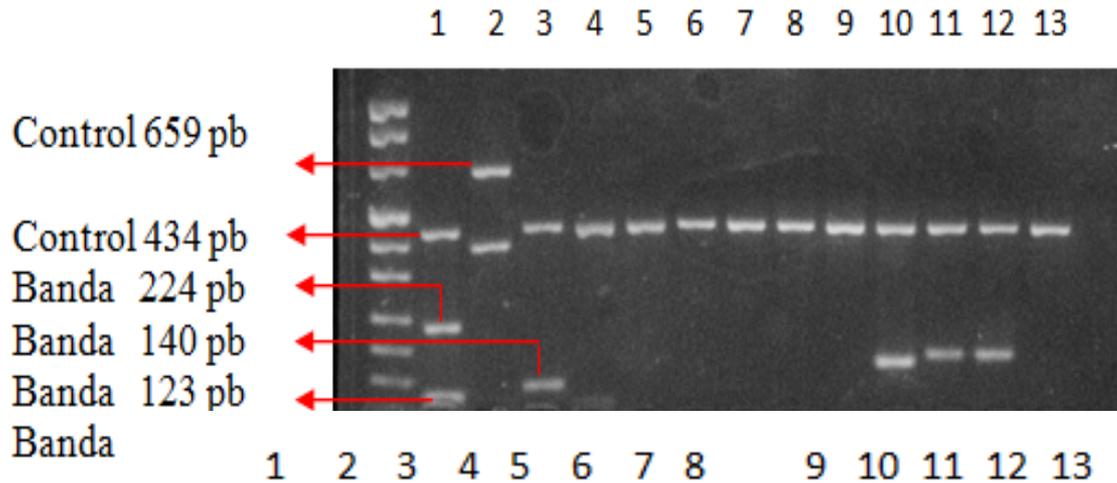
Resultados

Relación del fenotipo Rh en muestras D débiles y parciales del antígeno D

Variantes	N° de muestras	Fenotipo
Parcial DVI	1	
Parcial DCS	1	Cce
Parcial DCS	8	
D débil tipo 2	1	cEe
Parcial DCS	2	
D débil tipo 1	1	
D débil tipo 2	1	ce

Resultados

o Biología Molecular



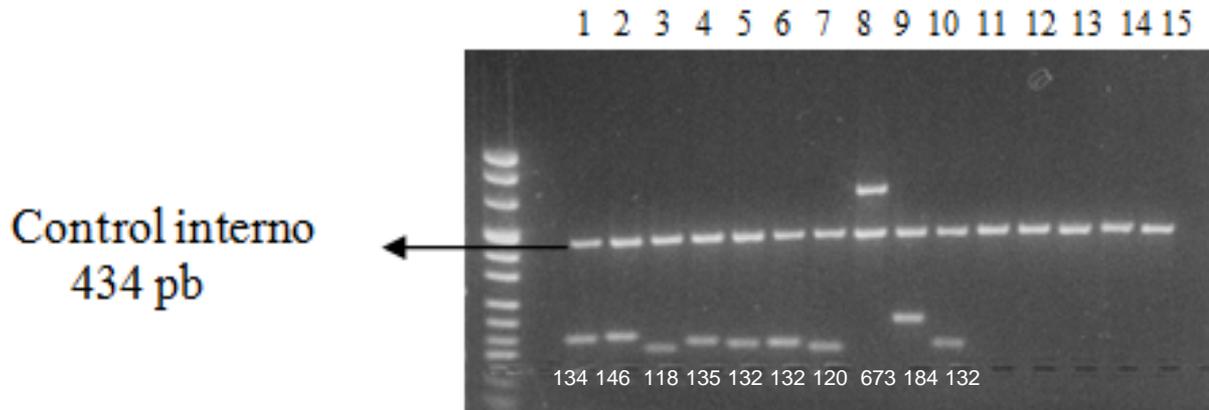
Reaktions-Nr. / Reaction No.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
PCR-Produkte / PCR products (Größe in bp/size in bp)		224 123	390 248 154		140	113	113	198	143	215	162	145	157	155	181
Reaktionsmuster / Reaction pattern		D ₀₁	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₄	D ₄	D ₄						
Phänotyp Phenotype	Genotyp Genotype	D ₇	RHD ^Y RHD ^Y	RHD ^Y reg.	RHD (K009K) reg.	RHD (K009K) reg.	RHD (K010K) reg.	RHD (K011K) reg.	RHD (K012K) reg.	Cde ¹	C ^c	C ^c	E	e	C ^w
Standard RHD/RHCE Alleles															
D-positive		+	+	+	+	-	-	-	-						
D-negative		-	-	-	-	-	-	-	-						
C										+	-	-	-	-	
C ^w										+	-	-	-	+	
c										-	+	-	-	-	
E										-	-	+	-	-	
e										-	-	-	+	-	

Größe der internen PCR-Kontrolle in Reaktion Nr. 2: 659 bp,
in allen anderen Reaktionen: 434 bp (HGH)
Size of internal PCR control in reaction no. 2: 659 bp,
in all the other reactions: 434 bp (HGH)

Resultados

- Partial -D Type

Variante DCS

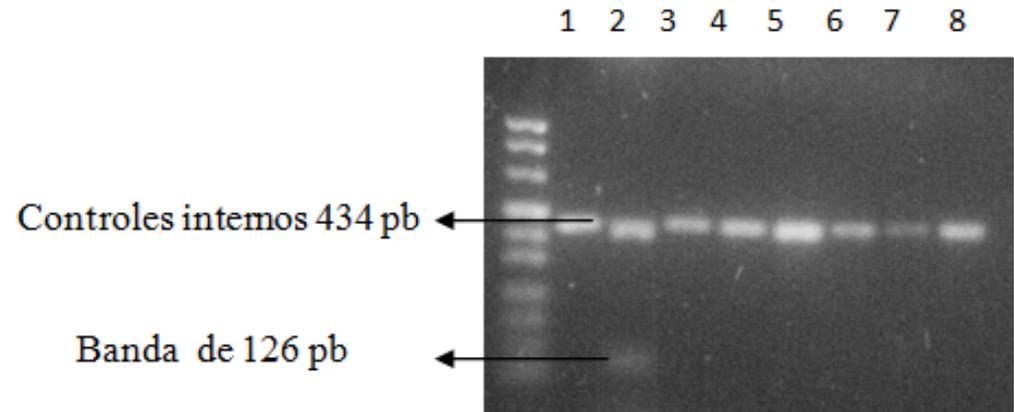


Resultados

○ Weak-D Type

Reaktions-Nr. / Reaction No.	1	2	3	4	5	6	7	8
PCR-Produkt (Größe in bp) PCR product (size in bp)	150	126	165	101	130	112	198	153
weak D Allele / weak D alleles								
weak D type 1	+	-	-	-	-	-	-	-
weak D type 2	-	+	-	-	-	-	-	-
weak D type 3	-	-	+	-	-	-	-	-
weak D type 4.0, 4.1	-	-	-	+	-	-	-	-
weak D type 4.2, DAR	-	-	-	+	+	-	-	-
weak D type 5	-	-	-	-	-	+	-	-
weak D type 11 (haplotype cDe)	-	-	-	-	-	-	+	-
RHD(M295I) (haplotype CD ₂ e)	-	-	-	-	-	-	+	-
weak D type 15	-	-	-	-	-	-	-	+
RHD pos. oder / or RHD neg.	-	-	-	-	-	-	-	-

D débil tipo 2



Resultados

N° de muestras y Variantes del antígeno D identificadas por PCR-SSP

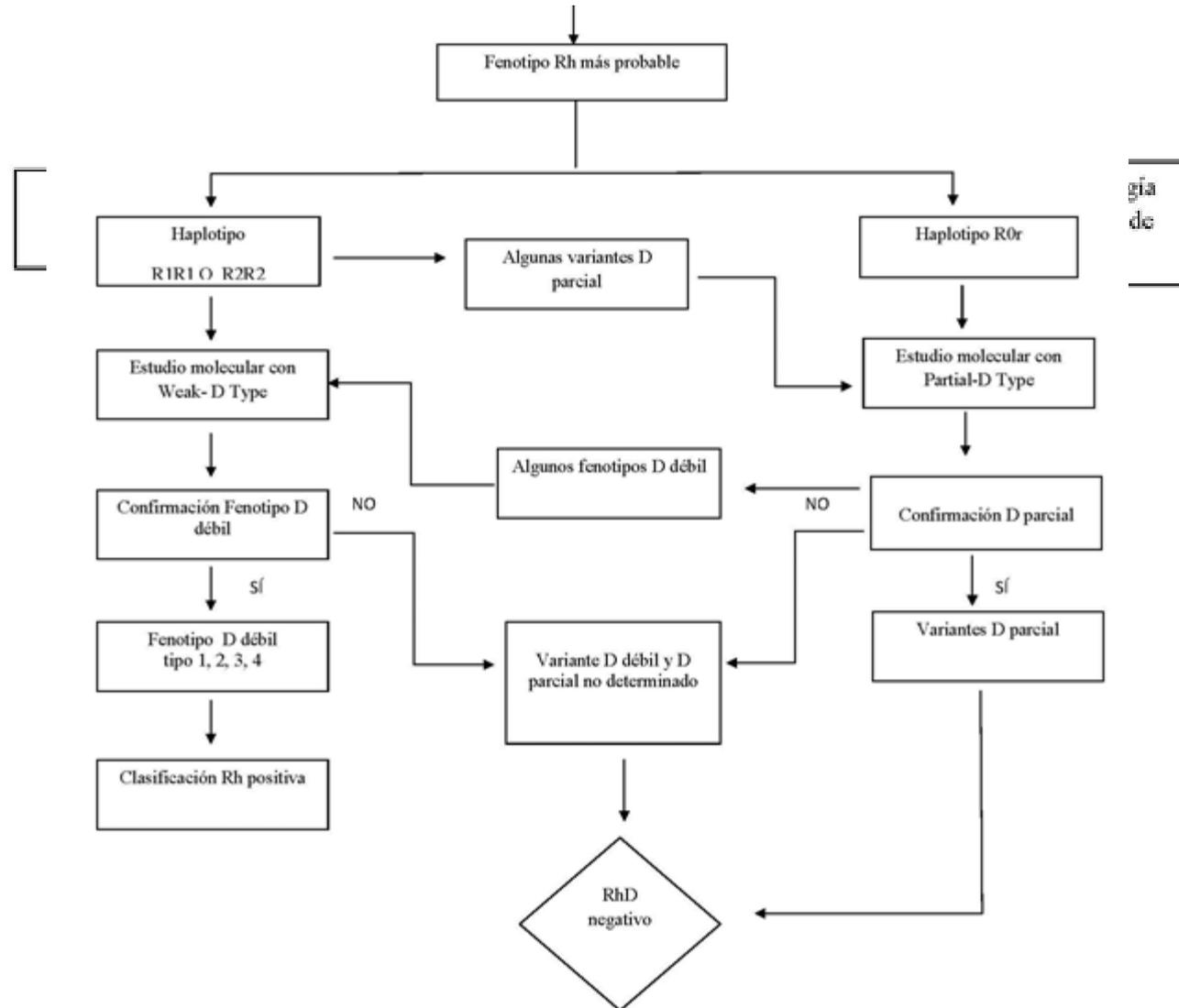
Muestras	Variantes (Parcial/D débil)
1	Parcial DVI tipo 4
11	Parcial DCS
1	D débil tipo 1
1	D débil tipo 2
4	Mezcla de variante parcial y D débil



Concordancia con serología

2 muestras
DVI - DCS

ALGORITMO



Discusión

- El alto grado de polimorfismos, otorga una importante variabilidad genética, dando formación a múltiples antígenos los que darían origen a distintos tipos de variantes RhD.
- En el caso de la variante DVI tipo 4, es una nueva variante descrita como un alelo híbrido RHD-Ce (3-5)-D, frecuente en España y Portugal y es potencialmente importante en medicina transfusional.
- Sin embargo, esta variante no puede ser discriminado del fenotipo DHMii por este kit PCR-SSP, ya que ambas variantes presentan un patrón de bandas idénticas. Serológicamente, esta variante presenta un patrón de expresión de los epítopes D idénticos a los otros tipos de variante DVI.

Discusión

- El hallazgo de encontrar dos tipos de variantes, éstas se encuentran bien documentada por estudios realizados por Wagner, quien utilizando biología molecular demostraron que fenotipos D débiles pueden expresar antígenos mutados o alterados y por lo tanto capaces de causar aloinmunizaciones.
- En la literatura existe poca información de la variante DCS, sin embargo el kit de biología molecular, lo señala como una variante no probada en la actualidad y que engloba a otras variantes también poco frecuentes.



Conclusión

- Sí se pudo determinar variantes débiles y parciales del antígeno D en donantes del Centro Metropolitano de Sangre y Tejidos.
- En base a los resultados, se puede concluir que las técnicas moleculares son fundamentales en la determinación de las variantes del antígeno D y en cuanto a las técnicas serológicas se necesita realizar futuros análisis para confirmar su validez.
- Se sugiere la importancia de realizar estudios de prevalencia en nuestro país de estos fenotipos y determinar la incidencia de estas en las RHT y en EHFRN.

AGRADECIMIENTO

- Instituto de Salud Pública de Chile
- Centro Metropolitano de Sangre y Tejidos
- A todos quienes fueron un aporte en este estudio