



Estudio del antígeno D por métodos serológicos y moleculares

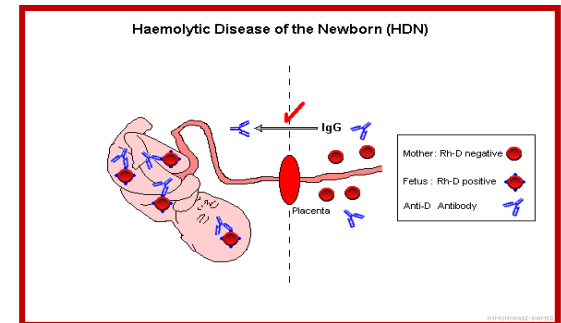
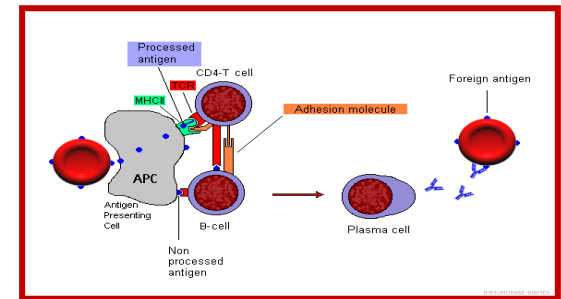
Tipificación de donantes, pacientes y gestantes

Dra. Rosana Clapsos

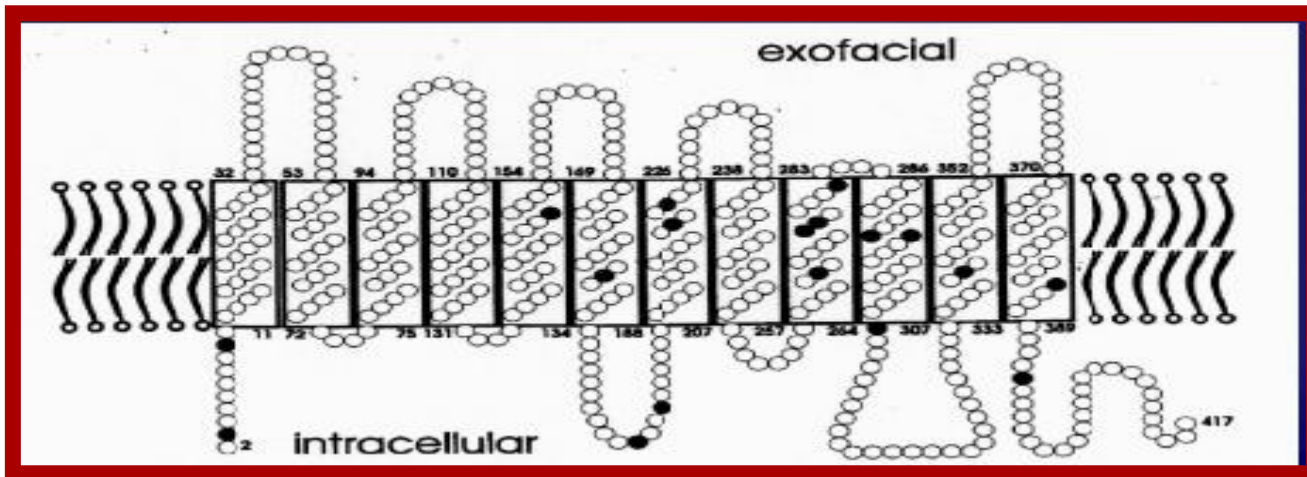
**Instituto de Hemoterapia de la Pcia. de Bs As
Centro Regional La Plata- Argentina**

Importancia clínica del antígeno D

- Alta inmunogenicidad de los eritrocitos Rh(D) **positivos** en sujetos Rh(D) **negativo**
- La frecuencia y severidad de la EHRN por anti-D.
- **Las dificultades técnicas asociadas a la tipificación Rh(D) de una proporción pequeña, pero significativa de pacientes y donantes.**



Proteínas Rh: RhD y RhCE



- Atraviesan la membrana 12 veces con 6 dominios extracelulares
- Asociadas al citoesqueleto (función estructural) - difieren 30-35 aminoác. homología 92%
- Proteína RhD: epitopes diferentes (modelo de 9 ep com 37 epitopes)
- Proteína RhCE :- antígenos C y/o c (2 dominio extracelular)
 - antígenos E y/o e (4 dominio extracelular)

Organization of the Rh genes

D



C/c

E/e

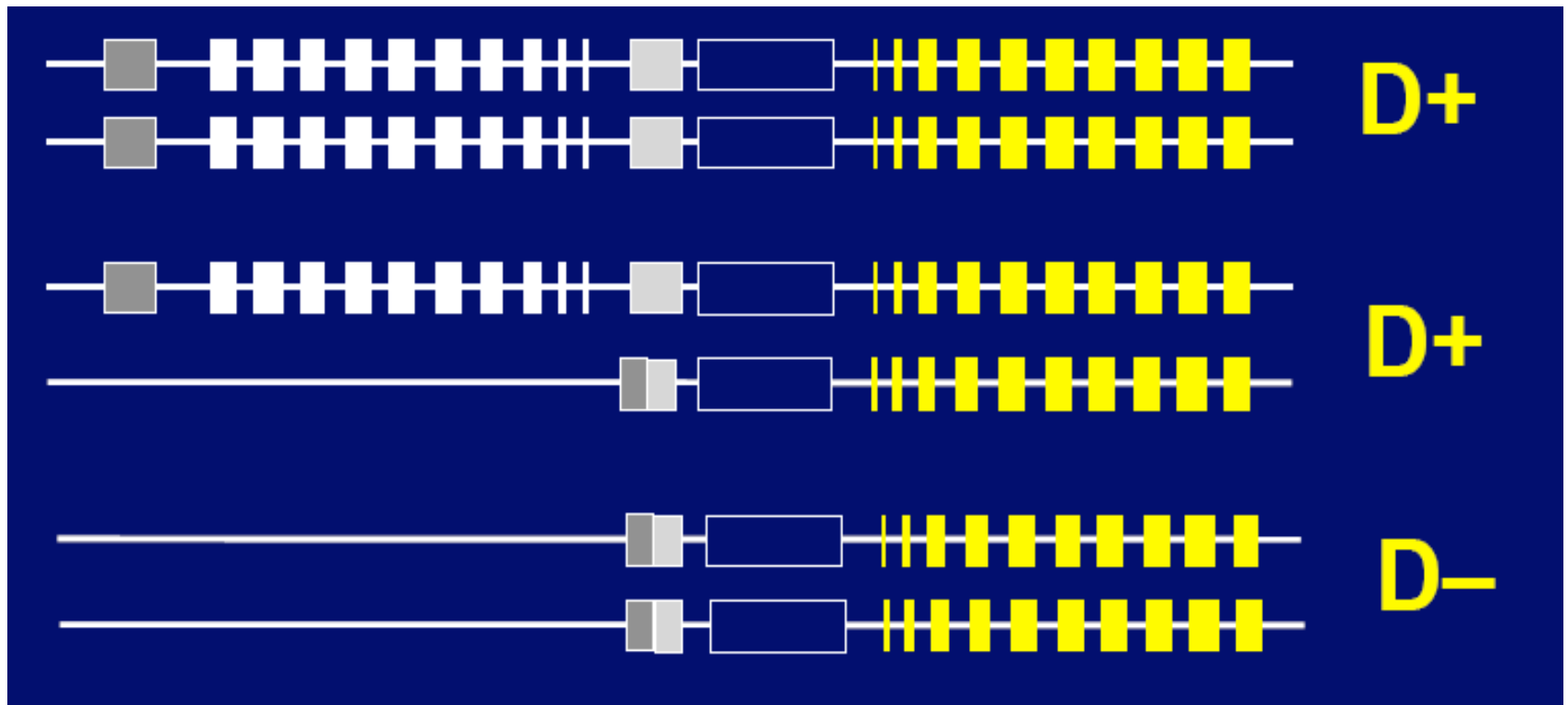
94%

sequence identity



RHD

RHCE



Rh (D) negativos: - Caucásicos 15 – 17%

- Africanos 5 %

- Asiáticos 3%

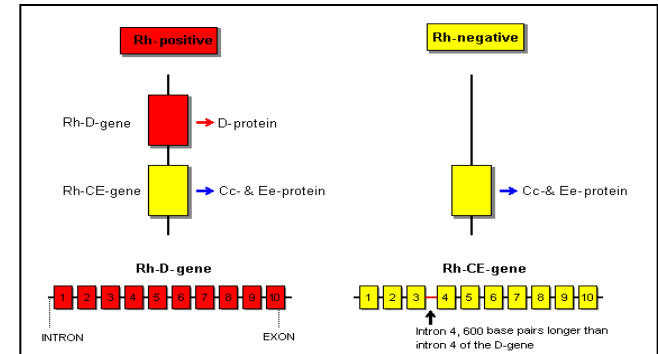
Antígeno D

- **D positivo** : Expresan el antígeno D
- **D negativo** : No expresan epitopes D
- **D variante** : Expresión alterada del antígeno D.
 - **D Débil, DEL** : cuantitativa
 - **D Parcial** : cualitativa

Rh (D) negativos

❖ **Caucásicos**: - Frecuencia **15 % -17%**

- Por delección del gen *RHD* entero.



❖ **Africanos**: - Frecuencia de Rh(D) negativos : **5%**

- 66 % tienen un *RHD* silente que causa un prematuro stop del codon y no se codifica una proteína funcional (*RHD-pseudogen RHD ψ*).

- 15 % lleva un gen híbrido *RHD-CE-D* que no expresa antígeno D y codifica un C alterado.

❖ **Asiáticos**: - Frecuencia de Rh(D) negativos : **3%**

- Por un gen híbrido *RHD-CE-D* .

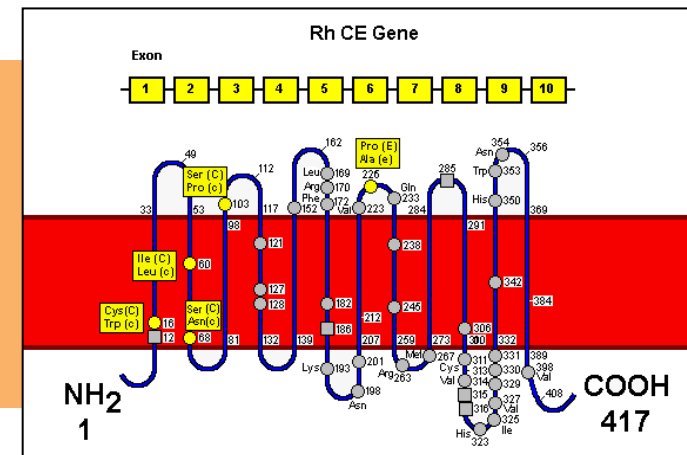
- 10 % - 30% de los fenotipos D negativos son **Del** con niveles muy bajos de antígeno D detectable por métodos comunes.

Rh (D) Debil

- **Menores** sitios de antígeno D pero con estructura antigénica normal.
 - Frecuencia en Caucásicos: 0.2 – 1 %

Los fenotipos D débiles pueden derivar de:

- Simples puntos de mutación en un aminoácido en la región intracelular o transmembrana de RhD.



- Densidad antigénica puede variar entre **550 a 100** (reaccionan sólo luego de la adición de suero de Coombs).

- **Antígeno D normal tiene > 10000 sitios antigénicos.**

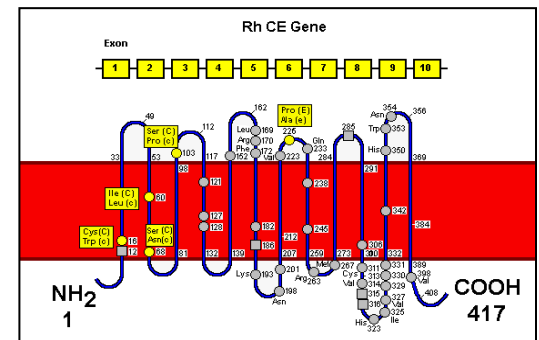
Antígeno D Parcial

- Poseen alterada la expresión del antígeno D por alteración en algunos de los epítopes.
- Frecuencia poblacional: 0.4 - 0.02 % dependiendo de la raza.

- Los puntos de mutación están localizados en la región **extracelular** y alteran o crean un nuevo epítopo.

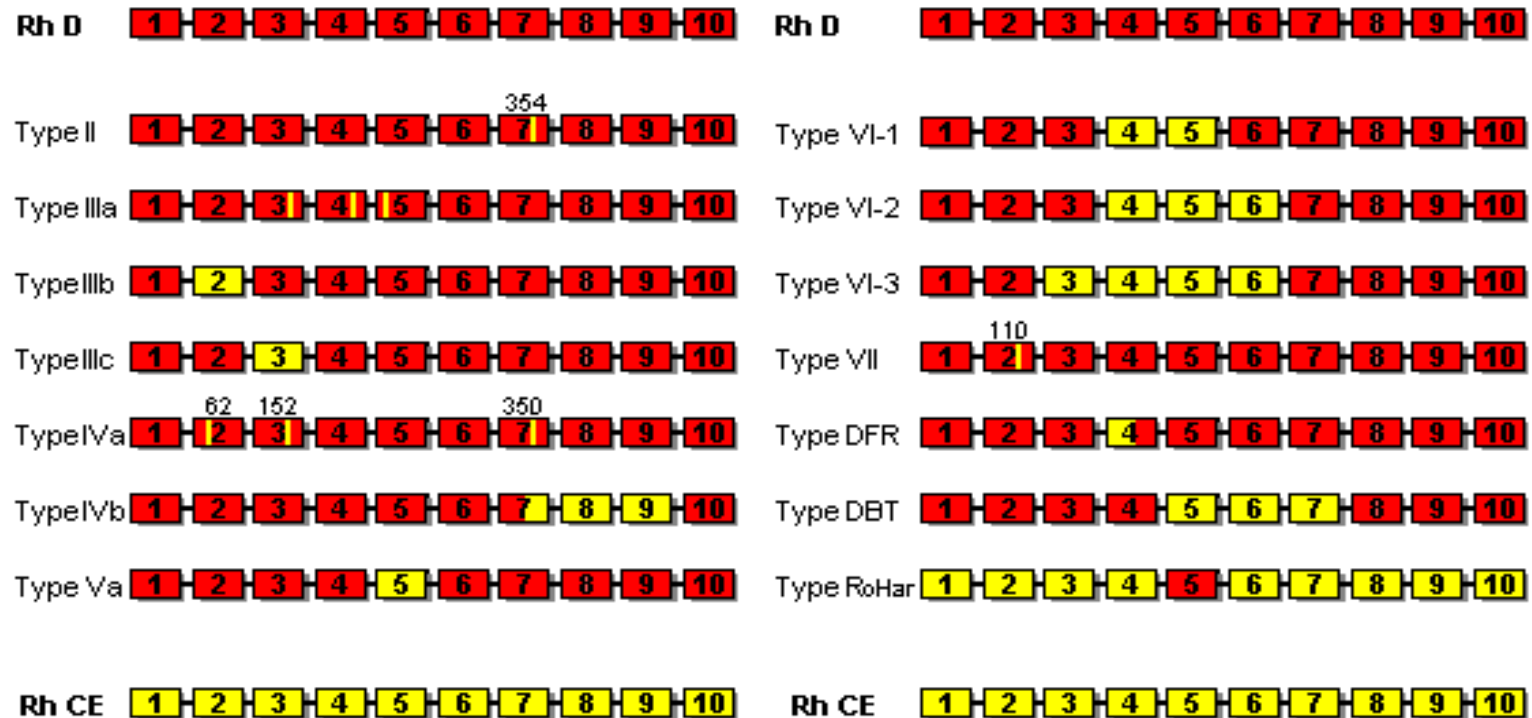
- Las variantes fenotípicas de D parciales pueden producirse :

- reordenamiento en bloc de ***RHCE* y/o *RHD***
- mutaciones puntuales
- mutaciones aleatorias
- **delección de nucleótidos**



- Pueden inmunizarse produciendo un aloanti-D

Overview of D-Variants



Polimorfismo Rh : - más de 100 en el gen *RHD*

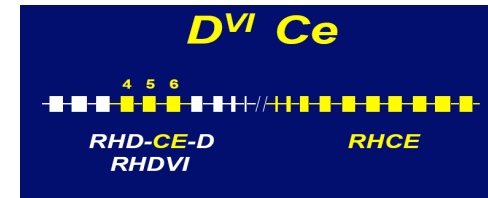
- más de 42 variantes en el gen *RHCE*

Variante D VI

Es la forma de D parcial más común en Caucásicos e importante desde el punto de vista clínico.

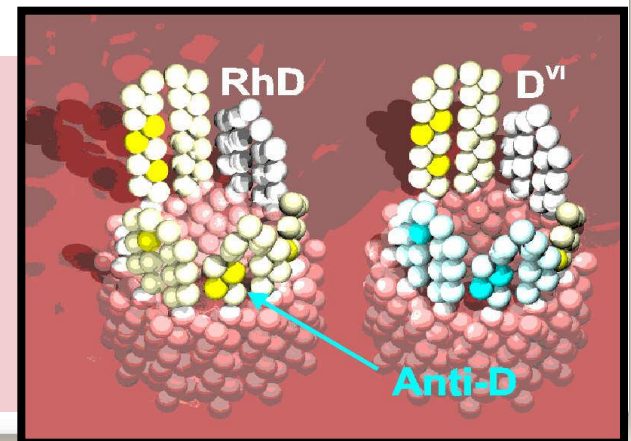
Carece de ep6/7

- Como producto de tres eventos se originan 4 tipos de D^{VI}
- **D^{VI} Tipo I** : gen *RHD* donde los exones 4 y 5 son remplazados por sus equivalentes del gen *RHCE*. **Nº de sitios antigénicos D: 500**
- **D^{VI} Tipo II** : gen *RHD* donde los exones 4 a 6 son remplazados por sus equivalentes del gen *RHCE*. **Nº de sitios antigénicos D: 2.400**
- **D^{VI} Tipo III** : gen *RHD* donde los exones 3 a 6 son remplazados por sus equivalentes del gen *RHCE*. **Nº de sitios antigénicos D: cerca de 12000**
- **D^{VI} Tipo IV**: gen *RHD* donde los exones 3 a 5 son remplazados por sus equivalentes del gen *RHCE*.



La literatura internacional nos alerta sobre la posibilidad de alo inmunización feto-materna o sensibilización de sujetos con formas de antígeno D^{VI} parcial transfundidos con células D normales.

Existen reportes de EHRN grave por aloanti-D producido por individuos D^{VI}..



Epitopes D expresados en algunos fenotipos D parciales

Partial D	Aminoácido alterados	Loop Involved	Epitopes presentes	Epitopes ausentes
D^{II}	354	loop6	1-5, 7-15, 17, 18, 19, 21, 22, 24, 12-22, 24, 27, 28, 3-37	6, 23, 25, 26, 29
D^{IIIb}	103	loop2	1-26; 28-37	27
D^{IVa}	350	loop3, loop6	6-15, 17-19, 21, 22, 25, 27, 28, 31-37	1-5, 23, 24, 26, 29, 30
D^{IVb}	350, 353, 354	loop6	7-15, 17-19, 21, 22, 25, 32, 33, 37	1-6, 23, 24, 26, 29, 30, 31, 34-36
D^{Va}	223, 233	loop4	3-6, 12-15, 17-19, 21-25, 27-30, 33-37	1, 2, 7-11, 26, 31, 32
D^{VI}	169, 170, 172, 223, 233	loop3, loop4	5, 9, 23-25, 30, 36, 37	1, 2, 3, 4, 6, 7-22, 26-29, 31-35
D^{VII}	110	loop2	1-15, 17-19, 21, 23-26, 29, 30, 33-37	22, 27, 28, 31, 32
DFR	169, 170, 172	loop3	1, 3, 5-8, 12-15, 23, 25, 29, 30, 34-37	2, 4, 9-11, 17-19, 21, 22, 24, 26-28, 31-33
DBT	223, 226, 233 350, 353, 354	loop4 loop6	12, 13, 17, 18, 22, 33, 37	1-11, 14, 15, 19, 21, 23-32, 34-36
Ro^{HAR}	103, 169, 170, 172, 350, 353, 354	loop2, 3, 6	7, 9, 12, 14, 17, 19	1-6, 8, 10, 11, 13, 15, 18, 21-37
DMH			1, 3-6, 10, 12, 13, 15, 17, 19, (20), 21, 23, 35-37	2, 7, 11, 18, (20), 22, 31, 32, 34
HMi	283	loop5	1-3, 5-10, 12-15, 17-19, 23, 35-37	4, 11, 21, 22, 31-34
K562/cE (loop3,4)D	169, 170, 172, 223, 226, 233	loop3, loop4	(10), 11, 12, 13, 17, (18), 19, 21	1-7, (10), 13, 15, (18), 22-37
K562/cE (loop4,6)D	223, 226, 233 350, 353, 354	loop4 loop6	(5), 6, (12), (15), (17), (23), 30, (36)	1, 3, (5), 7-11, (12), 13, (15), (17), 18-22, (23), 32, 33, 34, 35, (36), 37
K562/cE (loop3,4,6) D	169, 170, 172 223, 226, 233 350, 353, 354	loop3 loop4 loop6	3-21, 23, 30, 34, 36, 37	1, 22, 32, 34
K562/cE (loop 6)D	350, 353, 354		(5), (23)	1-4, (5), 6-22, (23), 24-37

Importancia clínica de las formas débiles del Ag D

Transfusion. 2000 Apr;40(4):428-34.

Primary anti-D immunization by weak D type 2 RBCs.

Flegel WA¹, Khull SR, Wagner FF.

Vox Sang. 2005 Feb;88(2):130-5.

Anti-D alloimmunization by weak D type 1 red blood cells with a very low antigen density.

Mota M¹, Fonseca NL, Rodrigues A, Kutner JM, Castilho L.

Transfusion. 2005 Apr;45(4):520-6.

Anti-D immunization by DEL red blood cells.

Wagner T¹, Körmöczí GE, Buchta C, Vadon M, Lanzer G, Mayr WR, Legler TJ.



Selección del reactivo Anti-D

Tener en cuenta:

- Tipificación donante/paciente
- Que variantes : D débil o D parcial ?
- Que reactivos hay disponibles
- Que métodos : tubo, gel, microplaca



Antígeno D

- **D negativo** : No expresan epitopes D: no aglutinan con anti-D.
- **D positivo** : Expresan el antígeno D. Reaccionan en medio salino (placa o tubo) con intensidad de +++ / ++++.
- **D variante** : Expresión alterada del antígeno D. Generalmente +/-, +, ++ y aquellos detectados por TCI.
- **DEL**: no aglutinan con anti-D

Reactivos Anti-D

- Monoclonales IgM
- Monoclonales blend: IgM + IgG
- Monoclonales IgG



Leer los insertos

- Instrucciones del fabricante
- Composición del reactivo
- Estabilidad y vencimiento
- Técnicas recomendadas
- Muestras
- Interpretación de los resultados
- Limitaciones
- Controles : Control Rh, Control Coombs, autocontrol



INSTRUCTIONS FOR USE

Anti-D monoclonal (IgM)

saline / human

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE

1. Product description

Anti-D monoclonal (IgM) is prepared from monoclonal, human Anti-D (IgM) (Clones: 597 Euclon and NaTH28-3c11) in isotonic saline. Anti-D monoclonal (IgM) is designed for use in tube and plate tests; and provides a specific, qualitative test for the detection of the corresponding D antigen on human red blood cells. This test reagent does not react with category VI. The test reagent contains $< 0.1\%$ NaN_3 as preservative.

The reactivity of each lot Anti-D monoclonal (IgM) is demonstrated by all given methods with several samples positive for the D antigen. The titer given on the label is determined by the tube test method with D positive red blood cells. The specificity of each lot is demonstrated by the recommended tube test method with a panel of red blood cells negative for the D antigen.

Reactivos Anti-D

This monoclonal IgM anti-D will directly agglutinate red cells from all known D categories including DVI and, therefore, is ideally suited for RhD grouping of donor samples. This reagent is not recommended for the RhD grouping of patient samples for the purpose of transfusion. The reagent will also directly agglutinate most weak D and unclassified partial RhD samples.

IgM LDM1 EpD 6/7

IgM ESD1M EpD 9

INTRODUCTION

First described in 1939, the RhD antigen is surpassed in importance only by the antigens of the ABO blood group system. Transfusion of RhD positive blood to a RhD negative recipient or failure to administer prophylactic anti-D to a RhD negative woman can result in the production of anti-D. Consequently, establishing the correct RhD group is

REAGENT DESCRIPTION

The main component of this reagent is derived from the *in vitro* culture of the human/mouse heterohybridomas LDM1 and ESD1M, which secrete IgM anti-D.

The formulation also contains EDTA and 1g/l sodium azide. The volume delivered by the reagent dropper bottle is approximately 40µl. Bearing this in mind, care should be

the United Kingdom and the British Committee for Standards in Haematology Blood Transfusion Task Force Guidelines for Compatibility Procedures in Blood Transfusion Laboratories recommend the following RhD grouping procedures:-

- For RhD grouping of patients, two different anti-D reagents should be used. Neither of these anti-D reagents should agglutinate DVI red cells by the method(s) recommended for use. Indirect antiglobulin tests for samples giving negative direct agglutination test results should not be used for RhD typing patient samples for the purpose of transfusion.
- For RhD grouping of donors, whilst it is neither essential nor possible to detect all weak D and partial RhD phenotypes, it is desirable that tests with two different anti-D reagents enable those donors who express weak or partial RhD antigen of clinical importance, eg DVI, to be classified as RhD Positive.

This monoclonal IgM anti-D will directly agglutinate red cells from all known D categories including DVI and, therefore, is ideally suited for RhD grouping of donor samples. This reagent is not recommended for the RhD grouping of patient samples for the purpose of transfusion. The reagent will also directly agglutinate most weak D and unclassified partial RhD samples.

INTERPRETATION OF LABEL SYMBOLS



Batch code



Use by (YYYY-MM-DD)



Storage temperature limitation (2°C– 8°C)



In vitro diagnostic medical device



Consult instructions for use



Harmful

INTENDED PURPOSE

This Anti-D reagent is for the *in vitro* detection and identification of human RhD blood group status in donor samples by direct agglutination.

REAGENT DESCRIPTION

The main component of this reagent is derived from the *in vitro* culture of the human/mouse heterohybridomas LDM1 and ESD1M, which secrete IgM anti-D. The formulation also contains EDTA and 1g/l sodium azide. The volume delivered by the reagent dropper bottle is approximately 40µl. Bearing this in mind, care should be

MANUAL DE INSTRUCCIONES

SUERO HEMOAGRUPADOR (Monoclonal)
..... Anti-D Optimum. AGLUTININA DIRECTA

Para uso diagnóstico in vitro

LDM1
ESD1M

EpD 6/7
EpD 9

INTRODUCCIÓN

Descrito por primera vez en 1939, el antígeno RhD solamente es superado en importancia por los antígenos del grupo ABO. La transfusión de sangre RhD positiva a un receptor RhD negativo o la omisión de administrar anti-D profiláctico a una madre RhD negativa, puede resultar en una producción de anti-D.

Por lo tanto, determinar el grupo Rh correcto es fundamental para una práctica transfusional segura. Ciertos individuos presentan una disminución cuantitativa en la expresión de su antígeno RhD, siendo clasificados como D débiles o "weak" (Du). Otros presentan una variación cualitativa en la expresión de su antígeno D, siendo conocidos como D parcial. Los individuos D débil también pueden ser D parcial.

La reciente disponibilidad de reactivos anti-D monoclonales IgM potentes, de alta calidad y un mayor conocimiento de la importancia clínica de los fenotipos D parciales, han producido cambios en las políticas de determinación del factor Rh en varios países. Un breve resumen de estas políticas se puede ver en la sección Notas Técnicas de este manual.

REACTIVO

Este reactivo anti D de uso in vitro sirve para la detección e identificación del grupo sanguíneo RhD humano en muestras de donantes y neonatos por medio de aglutinación directa. Este reactivo anti-D Optimum aglutinara de forma directa con la mayoría de los glóbulos rojos que presenten antígenos D, incluyendo DVI.

El componente principal de este reactivo se obtiene del cultivo in vitro de los heterohibridomas humano/murinos LDM1 y ESD1M que secretan IgM contra el antígeno RhD.

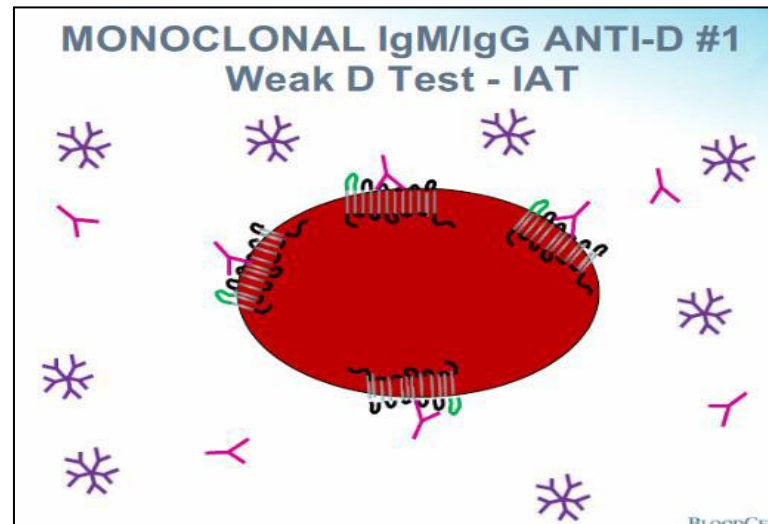
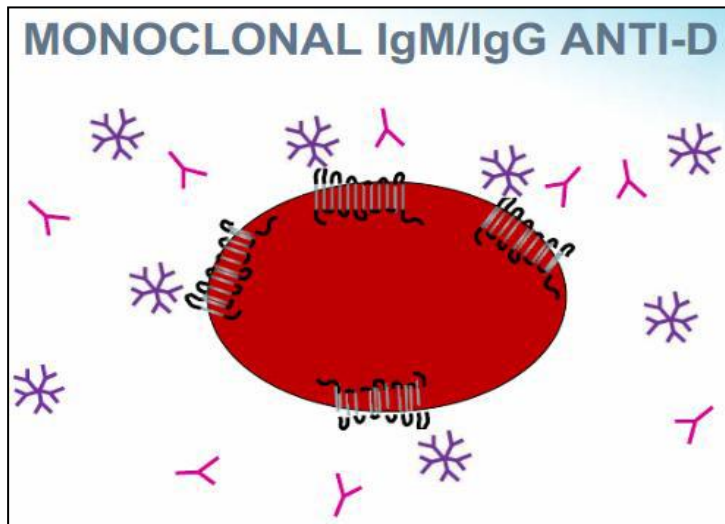
La formulación incluye EDTA y 1 g/l de azida sódica.

El volumen dispensado por el gotero del envase es de aproximadamente 40 µl. Teniendo esto en cuenta, se deben tomar los recaudos necesarios para asegurar que se mantenga la relación suero:células en todos los sistemas de ensayo.

Este reactivo cumple con las Especificaciones Técnicas Comunes de la Directiva de la Comunidad Europea para Dispositivos Médicos de Diagnóstico In Vitro.

Reactivos Anti-D blend IgM + IgG

Clones	- TH-28	IgM, Ep 6/7
	- MS-26	IgG, Ep 9



MANUAL DE INSTRUCCIONES

Slide & Tube Anti-D blend.

Suero Hemoagrupador Monoclonal Humano IgM/IgG.

Para uso diagnóstico in vitro.

INTRODUCCIÓN

Descrito por primera vez en 1939, el antígeno RhD solamente es superado en importancia por los

USO AL CUAL ESTÁ DESTINADO

REDIAR Slide & Tube Anti-D blend está destinado a la detección del antígeno RhD en la superficie de los glóbulos rojos humanos por aglutinación directa mediante las técnicas en lámina y tubo, salvo la parcialidad DVI y algunas variantes D débiles que son detectadas mediante la Prueba Anti-globulínica Indirecta. Este reactivo detecta la mayoría de las muestras de glóbulos rojos D débiles y D parciales incluyendo la categoría DVI.

Estos reactivos han sido diseñados para ser utilizados por personal entrenado en técnicas serológicas en inmunohematología.

REACTIVO

El componente principal de este reactivo se obtiene del cultivo in vitro de hibridomas humanos secretores de anticuerpos IgM/IgG contra el antígeno RhD:

Nombre del producto	Línea(s) celular(es)
Slide & Tube Anti- D blend	TH-28/MS-26

TH-28 EpD 6/7
MS-26 EpD 9

Estos reactivos han sido diseñados para ser utilizados por personal entrenado en técnicas serológicas en inmunohematología.

REACTIVO

El componente principal de este reactivo se obtiene del cultivo in vitro de hibridomas humanos secretores de anticuerpos IgM/IgG contra el antígeno RhD:

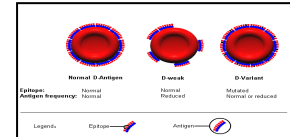
Nombre del producto	Línea(s) celular(es)
Slide & Tube Anti- D blend	TH-28/MS-26

Este reactivo está formulado con anticuerpos monoclonales humanos tipo IgM e IgG en una solución buffer que contiene potenciadores químicos, la formulación incluye además azida de sodio 0.1% (w/v) y material bovino. Este producto se provee esterilizado por filtración a 0.22 µm.

EpD 1-9	EpD1-37	Anticuerpos Monoclonales
EpD1	EpD1	LHM 169/81
	EpD2	LHM 70/45
EpD2	EpD3	P3X249
EpD3	EpD5	H41.11B7, LHM 76/55, P3X290, ESD1
EpD4	EpD4	BIRMA-1, SAU-3, LIH-1
EpD5	EpD7	CAZ7-4c5, HIRO-6
	EpD10	P3X241, P3X35
EpD6/7	EpD12	LOR17-8D3, P3AF6, MS201, P3X61, RUM-1, TH-28
	EpD13	17010C9, BRAD3, H2D5D2F5, LOR28-21D3, LDM1
	EpD15	BIRMA-DG3, D-90/17, L87.1G7, LHM 169/80, SAL17-4E8
	EpD17	HIRO-1, HS114, P3F17, LDM3
	EpD18	HG/92, ID6-H8, LHM 50/3.5, LHM 59/25, T3D2F7
	EpD21	D-90/12, RAB.B15
EpD8	EpD22	LHM 76/58, LHM59/19
EpD9	EpD23	BIRMA-D6, HIRO-4, HIRO-7, LHM 77/64, MS26
	EpD35	SALSA-12, ESD1M
	EpD36	BTSN6, LHM 76/59, NAU3-2E8, NAU6-4D5
	EpD37	822, HIRO-3, MCAD-6

Discrepancias Rh(D)

Variantes D



D débil	D parcial	DEL
Difícil diferenciarlas serológicamente !!		Expresión extremadamente baja
		- Solo por técnicas de adsorción-elución
- Reactividad débil, negativa o solo por TAGH - Algunos no detectados por técnicas serológicas	- Ausencia de reactividad con determinados reactivos monoclonales	



- Inmunoprofilaxis Rh(D) en gestantes
- Conducta transfusional

Evidencia clinica

- **Ag. D débil tipo 1, 2, 3 y 4.1 no son susceptibles de aloinmunización**
 - independientemente de la intensidad de reacción
 - ayuda a decidir la conducta transfusional u obstétrica

- **Ag. D parcial es susceptible de aloinmunización**

Ag. DEL es causa de inmunización en individuos D negativos

- Mínima expresión del Ag D capaz de sensibilizar?
- Evidencia de individuos inmunizados

Genotipificación *RH*

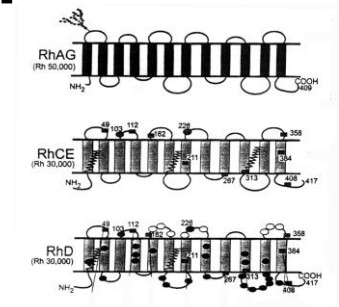
La determinación de las bases genéticas del Sistema Rh ha permitido el desarrollo de métodos de biología molecular para analizar la presencia del gen *RHD* en el ADN genómico obtenido de:

- sangre periférica
- amniocitos, células trofoblásticas
- ADN fetal obtenido del plasma de mujeres embarazadas D negativo

- Las metodologías moleculares descriptas son numerosas.

Consenso internacional:

- analizar dos regiones diferentes y distantes del gen *RHD*
- evaluar la presencia del alelo *RHD_ψ* y del alelo *r's*.



Genotipificación *RH*

Presencia / ausencia del gen *RHD*

PCR Multiplex



- D débiles
- D parciales
- Pseudogen
- Alelos nulos
- DEL



**PCR – SSP
Exón scanning
PCR – RFLP**

Chips de ADN (microarray)
Secuenciación de exones

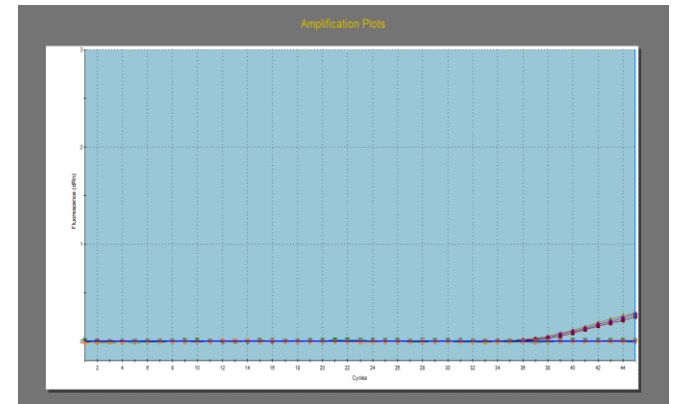
Importante avance en el manejo y prevención de la EHFN

Pacientes sensibilizadas

- Asesoramiento precoz (Riesgo real de EHFN)
- Evitar procedimientos invasivos (Riesgo de pérdida del embarazo)

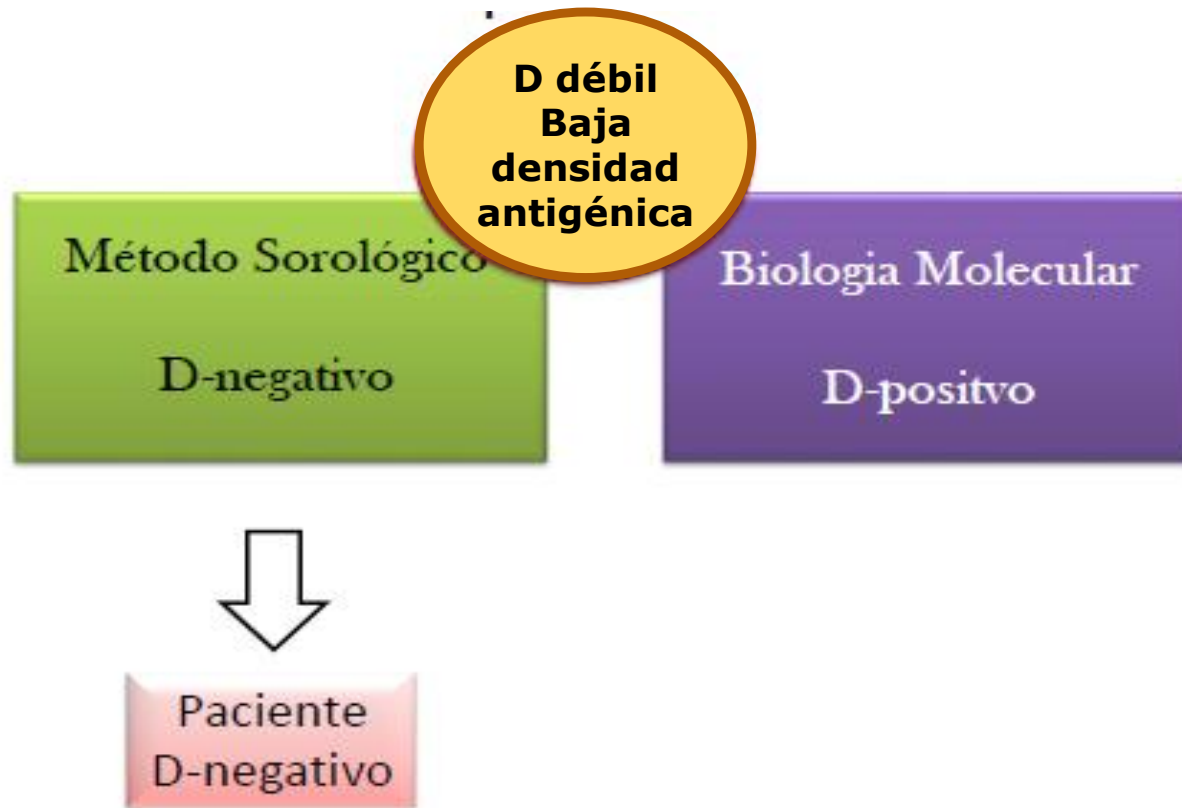
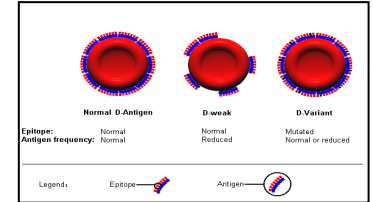
Pacientes no sensibilizadas

- Uso racional de la IgG anti-D
- Escasa - Costosa
- Exposición innecesaria a hemoderivados



Discrepancias Rh(D)

Variantes D



Consideraciones clínica de los Ag. D débil y D parciales

🏠- Podría ser conveniente determinar en forma específica su estado portador D (D Débil o el tipo variante D), con el fin de:

- Evitar el uso innecesario de unidades RhD negativas.
- Política más racional y segura de inmunoprofilaxis anti-D.

- Desafortunadamente los reactivos para métodos serológicos no distinguen entre estos GR.

- Los métodos moleculares para determinar el estado D puedan convertirse en rutinarios o más accesibles en un futuro

Discrepancia Rh(D)

Factores que pueden llevar a una discrepancia en la tipificación del Ag D

- Metodología utilizada (microplaca, tubo, gel)
- Reactivo monoclonal (línea/s monoclonales)
- Gran numero de variantes



Ante una discrepancia Rh(D):

- Repetir la tipificación con los reactivos originales
- Si se confirman los resultados, realizar pruebas con otros reactivos
- Evaluar las características de los reactivos: métodos, líneas celulares, reactividad con variantes
- Determinar si existe información en el instructivo del reactivo explicando la discrepancia, (verificar que en la literatura haya casos similares)
- Si esto no ocurre, contactar al fabricante
- Enviar la muestra a la prueba molecular



Estudio multicentrico

« Análisis serológico y molecular de las variantes D del Sistema Rh. Importancia en Medicina Transfusional »

Criterios de inclusión:

- Muestras con una reacción entre +/- y +++ con cualquier método.
- Muestras que reaccionen en fase antiglobulina .
- Muestras Rh(D) negativas CDE positivas.
- Muestras Rh(D) positivas que presentan aloanticuerpos anti-D

Determinación: Genotipificación *RHD*

Metodología: PCR alelo específica

Estudio multicentrico

« Análisis serológico y molecular de las variantes D del Sistema Rh. Importancia en Medicina Transfusional »

Determinación: Genotipificación *RHD*
Metodología: PCR alelo específica

Resultado: En la muestra de ADN estudiada se detectó el alelo *D débil tipo 3*

Se ha reportado que los pacientes (receptores/embarazadas) con fenotipo D débil tipo 3 pueden ser considerados RhD positivo ya que no serían susceptibles de desarrollar una aloinmunización hacia el antígeno D (*Wagner FF et al. Blood 2000; 95:2669-2708*).

Los donantes con fenotipo D débil tipo 3 deben ser considerados RhD positivo.

Variante	N	Donante	Paciente
D débil tipo 1	9	Rh(D) +	Rh(D)+
D débil tipo 2	19	Rh(D) +	Rh(D)+
D débil tipo 3	1	Rh(D) +	Rh(D)+
D parcial IV	3	Rh(D) +	Rh(D) neg
D parcial V	1	Rh(D) +	Rh(D) neg
D parcial VI tipo 4	1	Rh(D) +	Rh(D) neg
D parcial VI tipo 2	2	Rh(D) +	Rh(D) neg
RHD-CE (3-7)D (r)	7	Rh(D) neg	Rh(D) neg
RHD-CE (3-9) D	2	Rh(D) neg	Rh(D) neg
RHD-CE (4-8) D	1	Rh(D) neg	Rh(D) neg
D débil tipo 48 (182 GT)	1	Rh(D) neg	Rh(D) neg
DEL	2	Rh(D) +	Rh(D) neg
Dvar RHD (359 C-A)	2	Rh(D) +	Rh(D) neg
D neg (con alelo 581 insG)	1	Rh(D) neg	Rh(D) neg

Análisis serológico y molecular de las variantes D

Variante	N	Donante	Paciente
RHD-CE (3-7)D (r)	7	Rh(D) neg	Rh(D) neg
RHD-CE (3-9) D	2	Rh(D) neg	Rh(D) neg
RHD-CE (4-8) D	1	Rh(D) neg	Rh(D) neg
D débil tipo 48 (182 GT)	1	Rh(D) neg	Rh(D) neg
D neg (con alelo 581 insG)	1	Rh(D) neg	Rh(D) neg

Presencia de antígeno C, Fenotipo r'r

L. I.	37°C	TAGH	PCD
0	0	0	0



Informe de BM

Conducta :

- Donante Rh(D) negativo
- Paciente Rh(D) negativo

Análisis serológico y molecular de las variantes D

Variante	N	Donante	Paciente
D parcial VI tipo 4	1	Rh(D) +	Rh(D) neg
D parcial VI tipo 2	2	Rh(D) +	Rh(D) neg

Presencia de antígeno C

L. I.	37°C	TAGH	PCD
0	0	2+/3+	0

Informe de BM

Conducta :

- Donante Rh(D) positivo
- Paciente Rh(D) negativo

Análisis serológico y molecular de las variantes D

Variante	N	Donante	Paciente
D débil tipo 1	9	Rh(D) +	Rh(D)+
D débil tipo 2	19	Rh(D) +	Rh(D)+
D débil tipo 3	1	Rh(D) +	Rh(D)+

Presencia de antígeno C en D débil tipo1

Presencia de antígeno E en D débil tipo2

L. I.	37°C	TAGH	PCD
0/1+/2+	2+/3+	2+/3+	0



Informe de BM

Conducta :

- Donante Rh(D) positivo
- Paciente Rh(D) positivo

Análisis serológico y molecular de las variantes D

Variante	N	Donante	Paciente
D parcial IV	3	Rh(D) +	Rh(D) neg
D parcial V	1	Rh(D) +	Rh(D) neg

Presencia de antígenos ce

L. I.	37°C	TAGH	PCD
1+/2+	2+	2+/3+	0

Informe de BM

Conducta :

- Donante Rh(D) positivo R_0r
- Paciente Rh(D) negativo $r'r$

Análisis serológico y molecular de las variantes D

Variante	N	Donante	Paciente
DEL	2	Rh(D) +	Rh(D) neg

Presencia de antígeno C

Sólo captadas por técnicas de BM !!

L. I.	37°C	TAGH	PCD
0	0	0	0

Informe de BM

Conducta :

- Donante Rh(D) positivo R_0r
- Paciente Rh(D) negativo $r'r$

Análisis serológico y molecular de las variantes D

Variante	N	Donante	Paciente
Dvar RHD (359 C-A)	2	Rh(D) +	Rh(D) neg



Presencia de antígeno E

L. I.	37°C	TAGH	PCD
0	2+	3+	0

Informe de BM

Conducta :

- Donante Rh(D) positivo R_2r
- Paciente Rh(D) negativo $r''r$

MUESTRA DE PACIENTE:



- **GRUPO ABO:** A

- **Factor Rh(D):**

L. I.	37°C	TAGH	PCD
2+	2+	----	0

- Fenotipo Rh: ce/ce

- INFORME DE *Genotipificacion RHD* (PCR alelo especifica):

- **D parcial tipo 4** responsable de fenotipo D parcial



Donante: Rh(D) positivo R₀r

Paciente: Rh(D) negativo rr

Discrepancias RhD

Método serológico
0, 1+, 2+
TAG (solo para donantes)

Biología Molecular
D débil
tipo 1, 2 y 3

D débil
con baja
densidad
antigénica

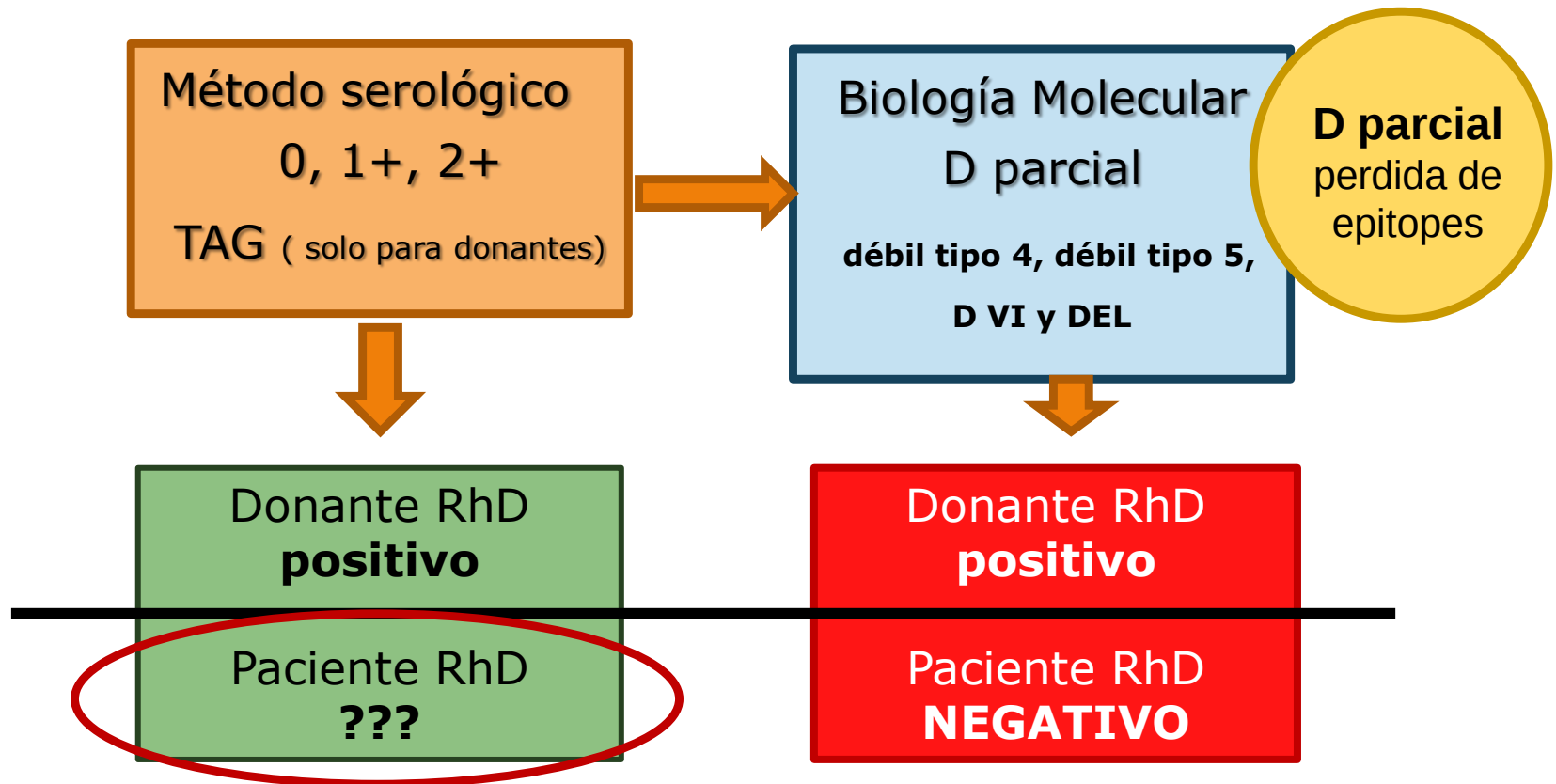
Donante RhD
positivo

Donante RhD
positivo

Paciente RhD
???

Paciente RhD
positivo

Discrepancias RhD



Para definir:

- Tipificación Rh(D) en **pacientes**: qué hacemos con las muestras que resulten por métodos serológicos 1+ y 2+ ???
- Uso de unidades Rh(D) negativo con **CDE +** (r' r, r''r)
- Implementar técnicas de BM en todos los bancos de sangre??

A la hora de caracterizar el estado portador D debemos *a priori* distinguir entre donantes y pacientes.

 **Donantes y Recién Nacidos:** es necesario utilizar un reactivo anti-D capaz de determinar el estado D parcial (por lo menos D ^{VI}) y D débil.

 **Puérperas y pacientes :** es necesario utilizar un reactivo anti-D incapaz de determinar el estado D parcial (reactivo D ^{VI} negativo) y D débil. Es mejor considerar a estos pacientes como de Factor Rh (D) negativos.

- Ley Nacional 22990- Normas técnicas y administrativas
- Ley Provincial de Hemoterapia 11725/95- Normas técnicas 2013

Conclusión

- **Donantes y Neonatos:** es necesario captar la expresión de antígeno D débil , realizando una correcta elección de reactivos anti-D y métodos sensibles complementarios (x ej técnica de TAG), para poder clasificarlos como Rh(D) positivos.
- **Pacientes y gestantes:** Una reacción $\leq 2+$ **EN LECTURA INMEDIATA en la tipificación D** es mejor considerarlos **Rh(D) negativo** . NO UTILIZAR TAG PARA TIPIFICAR ANTIGENO D.
- **Unidades CDE+** : Evitar su uso en mujeres en edad fértil , niñas y jóvenes.
- Necesidad de implementación de técnicas de BM en más centros !!



MUCHAS GRACIAS !!!

