

TIPIFICACIÓN MOLECULAR POR PCR DE FENOTIPOS D DÉBIL Y/O D PARCIAL EN MUESTRAS CON GRUPO SANGUÍNEO RH DISCREPANTE

Expositor:
TM Alejandro Cerda Acevedo

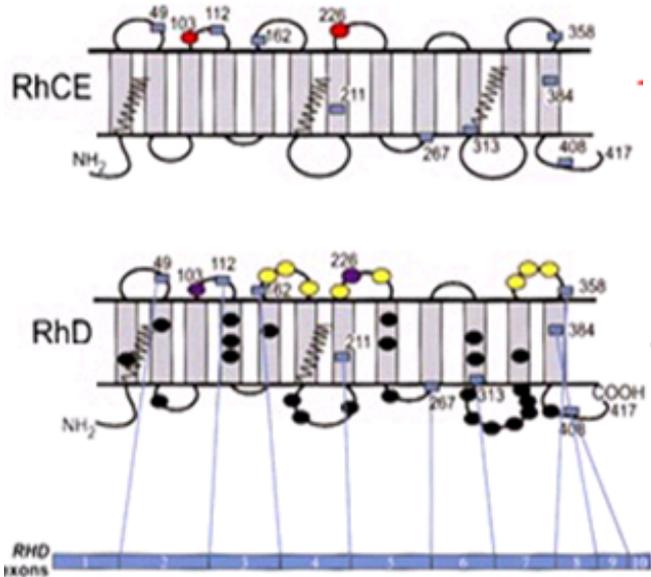
Docente guía:
Bq. Genevieve Merabachvili

Introducción

Antígenos del sistema de grupo sanguíneo Rh

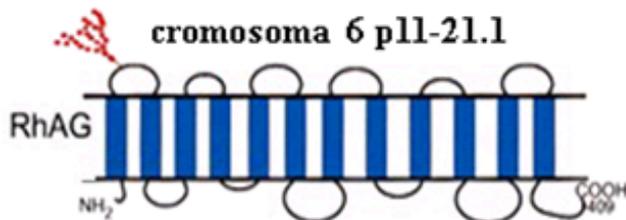
Número	CDE	Rh-Hr	Número	CDE	Rh-Hr	Número	CDE	Rh-Hr
1	D	Rh ₀	22	CE	-	41	Ce-like	rh ₂ -like
2	C	rh'	23	WieL, D ^w	-	42	Ce ^s	rh ^H -like
3	E	rh''	24	E ^T	-	43	Crawford	-
4	c	hr'	26	Deal, c-like	-	44	Nou	-
5	e	hr''	27	cE	-	45	Riv	-
6	f, ce	hr	28	-	hr ^H	46	Sec	-
7	Ce	rh ₂	29	"Total Rh"	-	47	Dav	-
8	C ^w	rh ^{w1}	30	Go ^x	-	48	JAL	-
9	C ^x	rh ^x	31	e-like	hr ^B	49	STEM	
10	V, ce ^s	hr ^s	32	≠		50	FPTT	
11	E ^w	rh ^{w2}	33	S		51	MAR	
12	G	rh ^G	34	Bas	HrB	52	BARC	
17	*	Hr ₀	35	1114	-	53	JAHK	
18	↑	Hr	36	Be ^s	-	54	DAK	
19	-	hr ^s	37	Evans	-	55	LOCR	
20	VS, cs	-	39	C-like	Hr0-like	56	CENR	
21	C ^G	-	40	Tar	-			

Antígenos Rh



**8 aminoácidos
específicos**
24 aminoácidos TM e IC

91.61% de
homología
entre ambas
proteínas

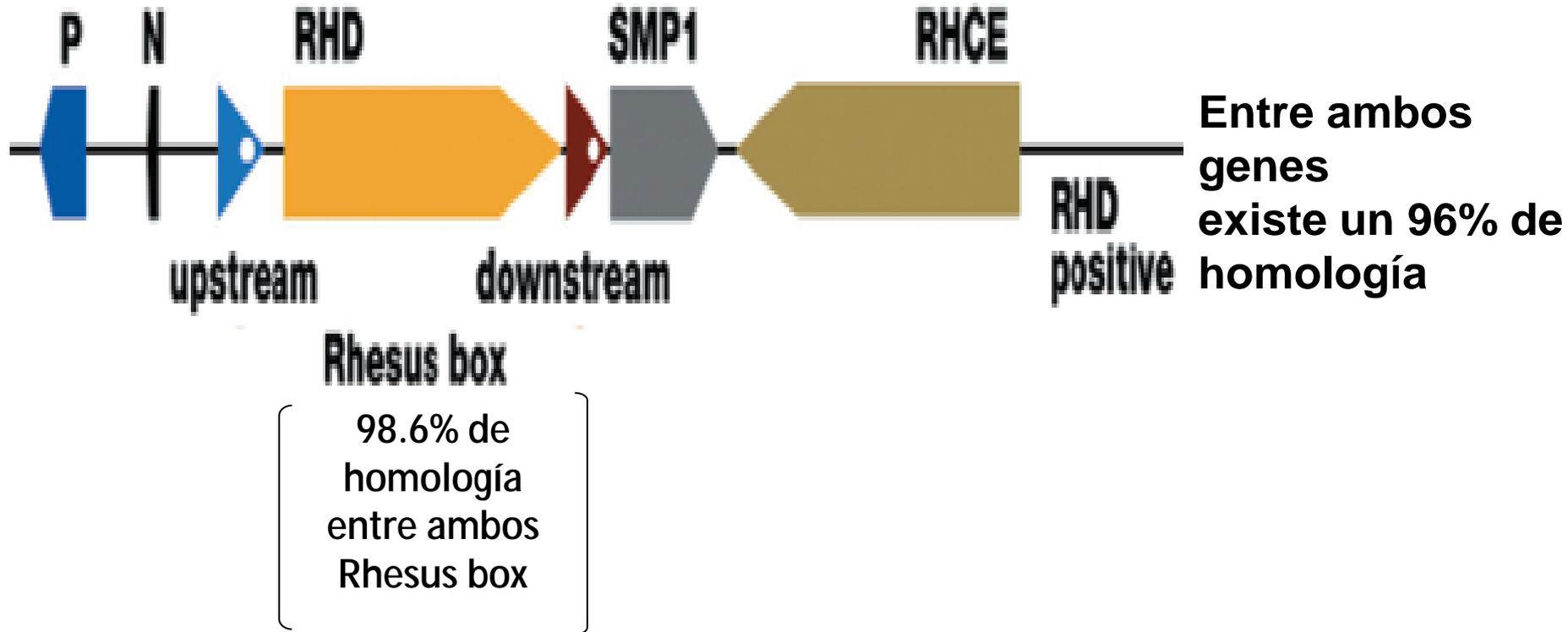


40% de homología con proteínas Rh

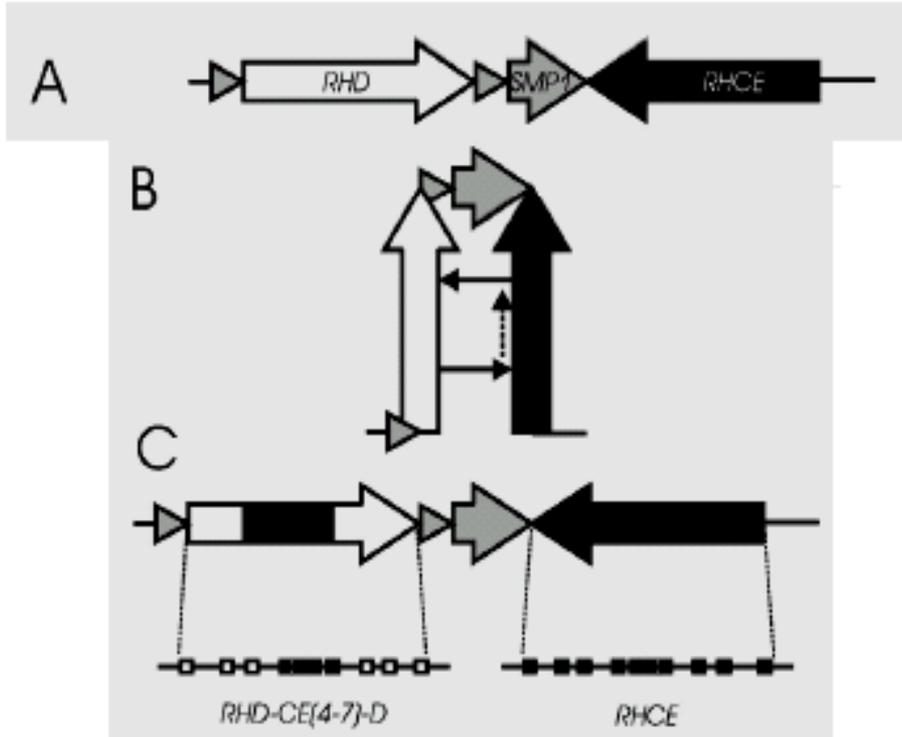
Mutaciones producen fenotipo Rh *null*

Genes del sistema Rh

cromosoma 1p34.3-36.1



Formación de alelos híbridos



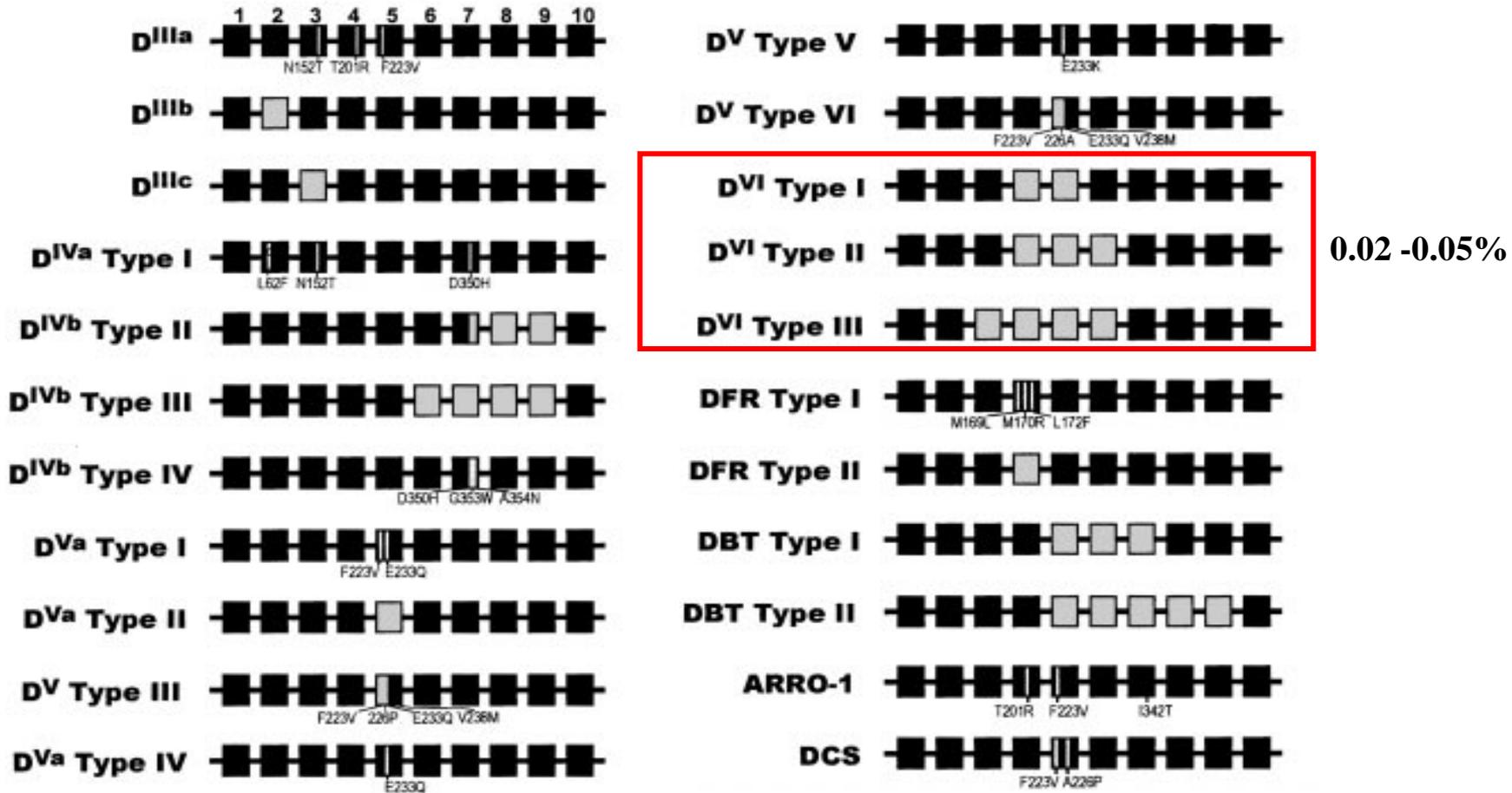
B: Conversión génica en *cis*

C: *RHD-RHCE-RHD*

Blackwell Scientific Publications; 1997; 163-20

Cambios extracelulares  Pérdida de epítopes D

Fenotipos D parcial

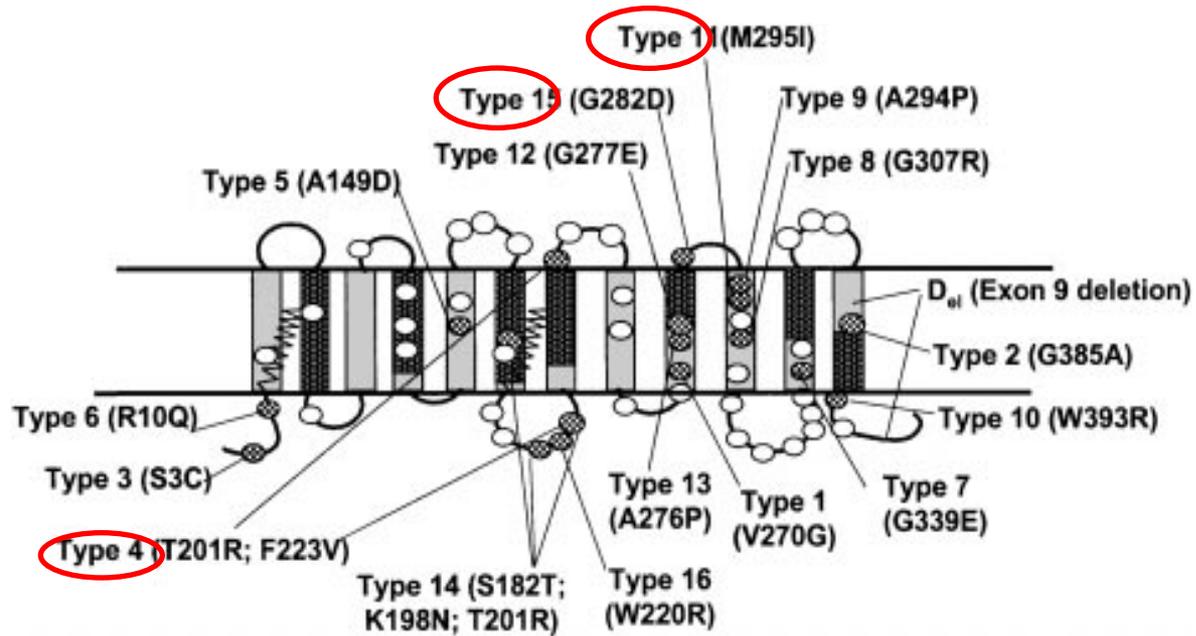


Mecanismo molecular de los fenotipos D débiles más comunes

Frecuencia: 0.2 - 1%

Nombre	Cambio nucleotídico	Exón	Alelo	Localización en membrana	% entre fenotipos D débiles
D débil tipo I	T→G 809	6	<i>RHD</i> (V270G)	TM	70.29
D débil tipo II	G→C 1154	9	<i>RHD</i> (G385A)	TM	18.01
D débil tipo III	C→G 8	1	<i>RHD</i> (S3C)	IC	5.19
D débil tipo IV	C→G 602, T→G 667, G→A 819	4	<i>RHD</i> (T201R, F223V)	IC	1.30
* TM: transmembrana; IC: intracelular					

Fenotipos D débiles



76 tipos

Blood 2000; 95: 375-387

Determinación serológica del fenotipo Rh

	D II	D III	D IV	D Va	D VI	D VII	DFR	DBT	DNB	DHAR	HMI	DHM			
MS-201	4+	4+	3/4+	4+		3/4+		3/4+	4+	3+					
RUM 1	4+	4+	3/4+	4+		3/4+		3/4+	4+	3+					
LDM 1	4+	4+	3/4+	4+		3/4+		3/4+	4+						
LDM 3	4+	4+	3/4+	4+		3/4+	+/-	3/4+	4+						
TH-28	4+	4+	2+	2+		2+		2+	2+	0/2+					
ESD-1M											2+	2+			
		D II	D III	D IV	D Va	D VI	D VII	DFR	DBT	DNB			DHAR	HMI	DHM
	TH-28	4+	4+	3+	3+		3+		3+	3+			0/2+		
MS-26											4+	4+			
ESD-1				4+				3+				4+	4+		

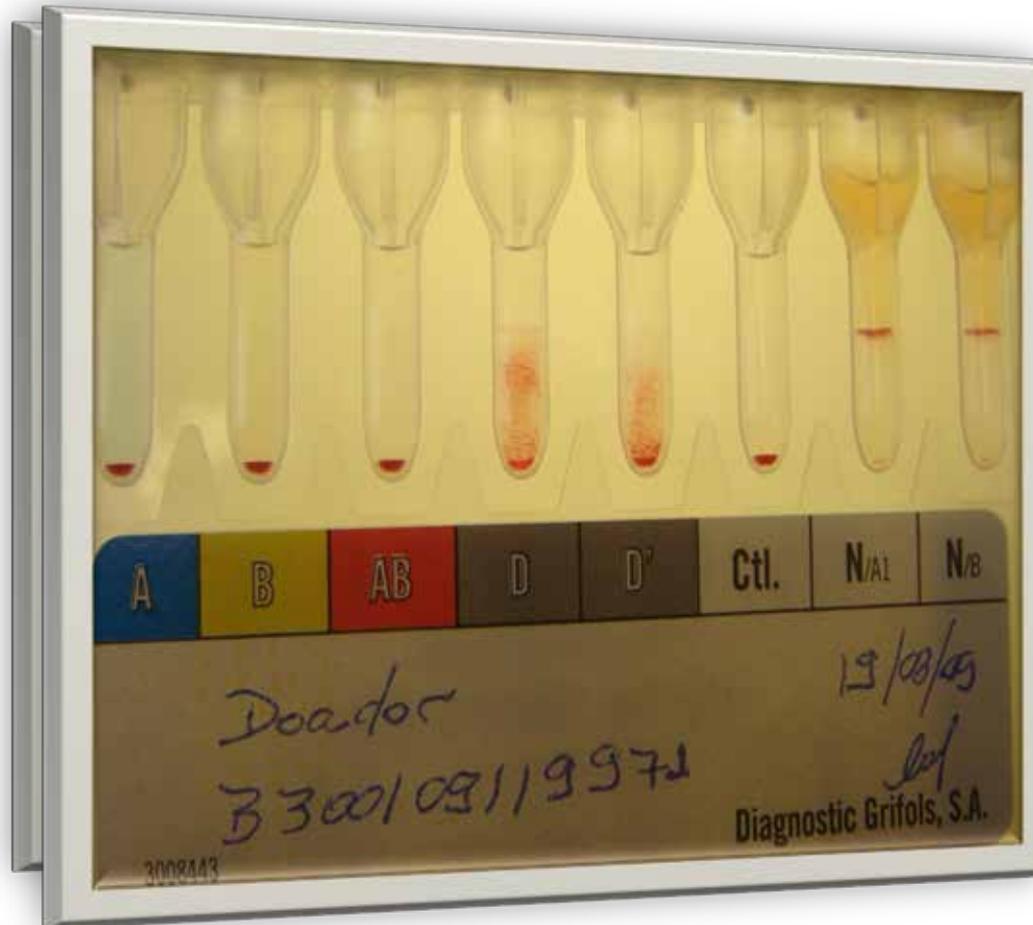
Clon	D débil		
	Tipo I	Tipo II	Tipo III
MS-201	4+	4+	4+
RUM- 1	4+	4+	4+
LDM-1	4+	4+	4+
LDM-3	4+	4+	4+
TH-28	4+	4+	4+

9; 94: 3986-3996.

Determinación serológica del grupo Rh



Fenotipos Rh discrepantes



Hipótesis

“La tipificación molecular por PCR del gen *RHD* permite diferenciar los fenotipos D débil y/o D parcial en muestras con fenotipo Rh discrepante”.

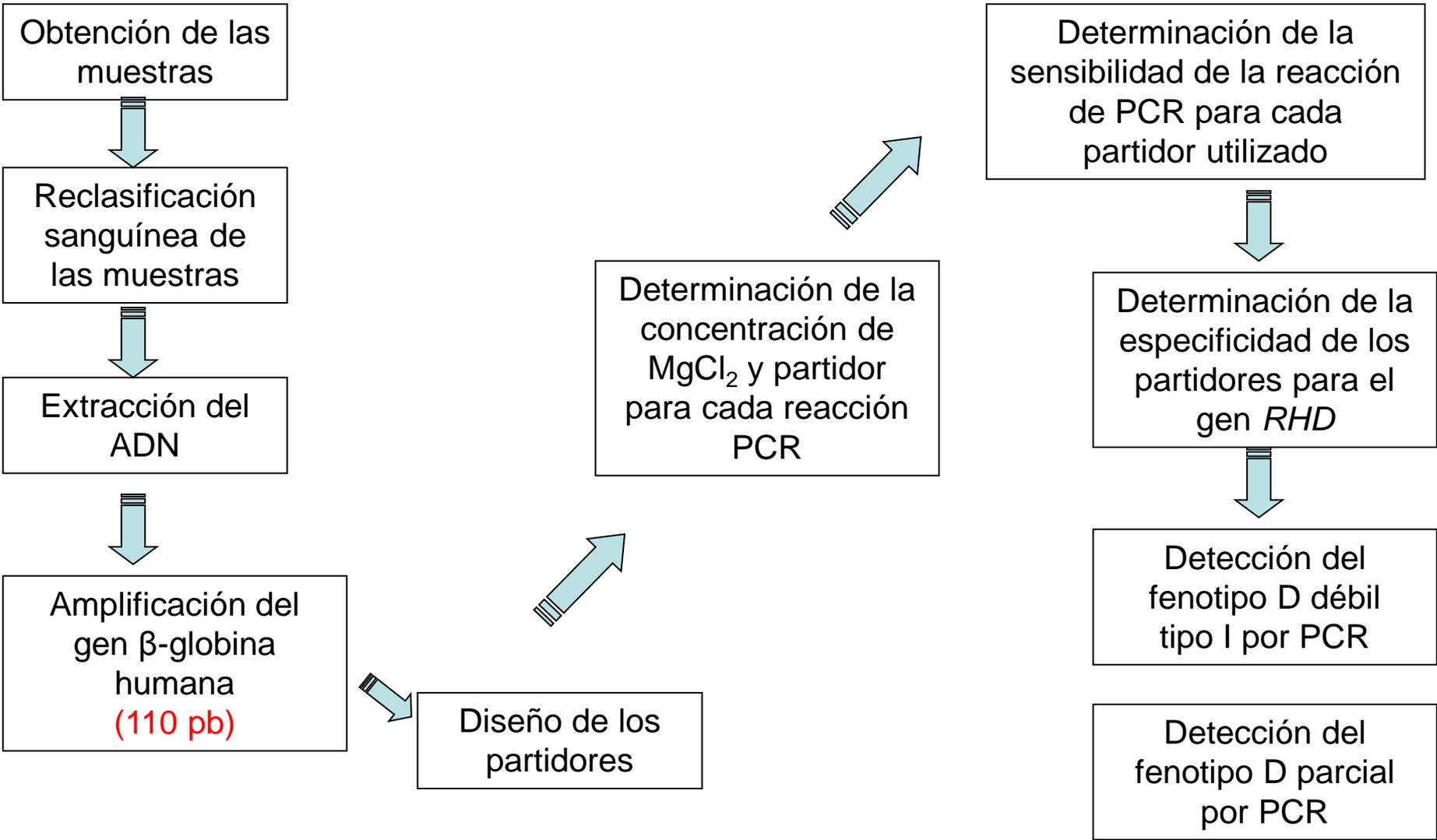
Objetivo General

Establecer mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) un método que permita identificar el fenotipo D débil tipo I o D parcial en aquellas muestras que presentan una clasificación Rh discrepante.

Objetivos Específicos

1. Reclasificar por técnica en gel y en tubo el grupo sanguíneo de las muestras que presentan un fenotipo presuntivo de D débil y muestras Rh discrepantes.
2. Implementar y estandarizar mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) un método para la caracterización definitiva de fenotipos D débil y D parcial.
3. Determinar el genotipo Rh más probable en las muestras con fenotipo presuntivo de D débil.

Metodología



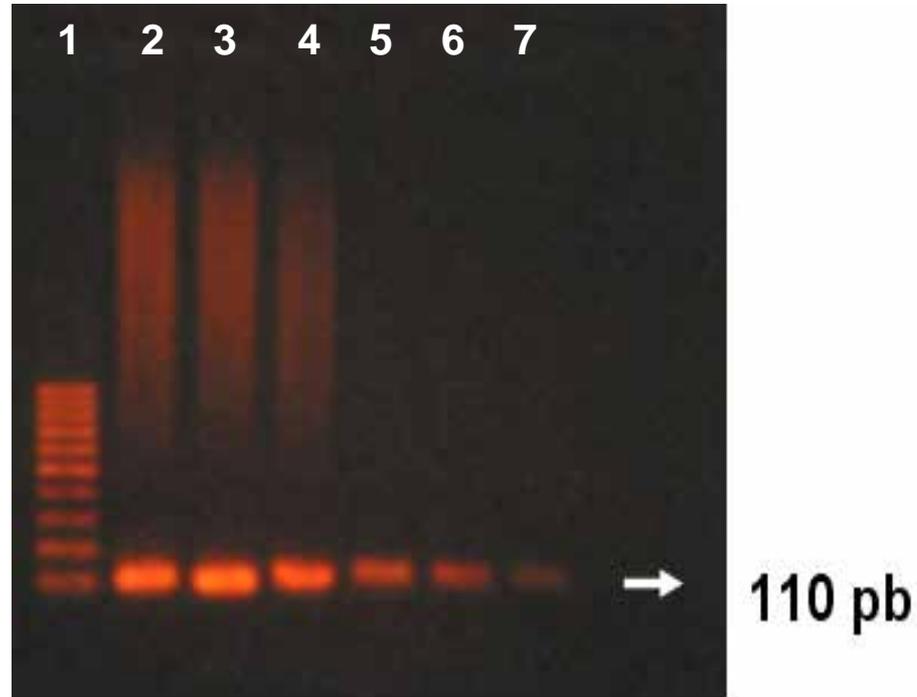
Resultados

Obtención de las muestras

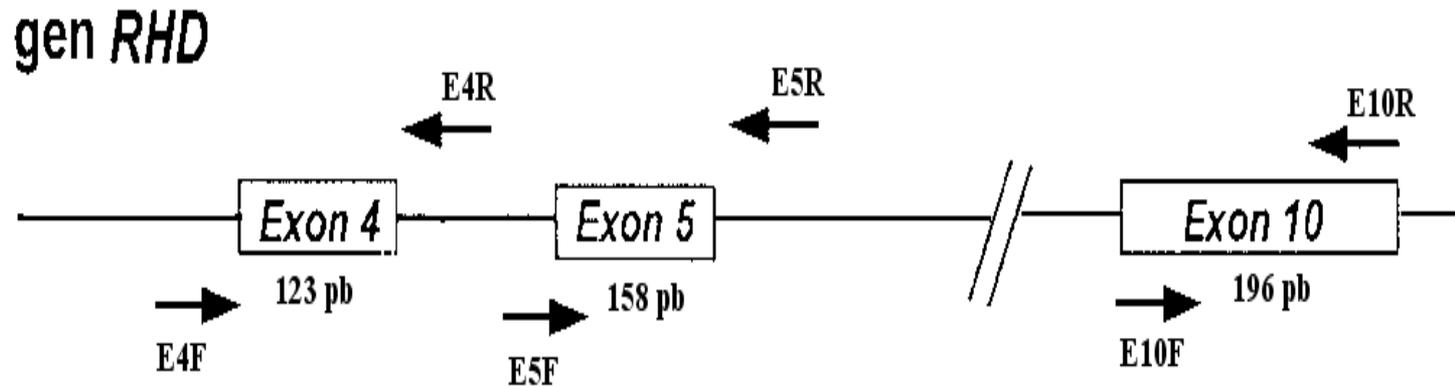


- Registro de fichas clínicas en Banco de Sangre de la Clínica Santa María (1/11/2009 – 31/12/2010)
- 2.528 determinaciones de grupo sanguíneo
- 50 determinaciones con fenotipo presuntivo de D débil y/o D parcial (2 %)
- 4 muestras Rh negativas con test de D^u positiva
- 3 muestras con fenotipo Rh discrepante del Banco de Sangre del Hospital San José
- 1 muestra con fenotipo presuntivo de D parcial proveniente del Hospital Clínico de la Universidad Católica de Chile
- 4 muestras Rh positivas y 12 muestras Rh negativas

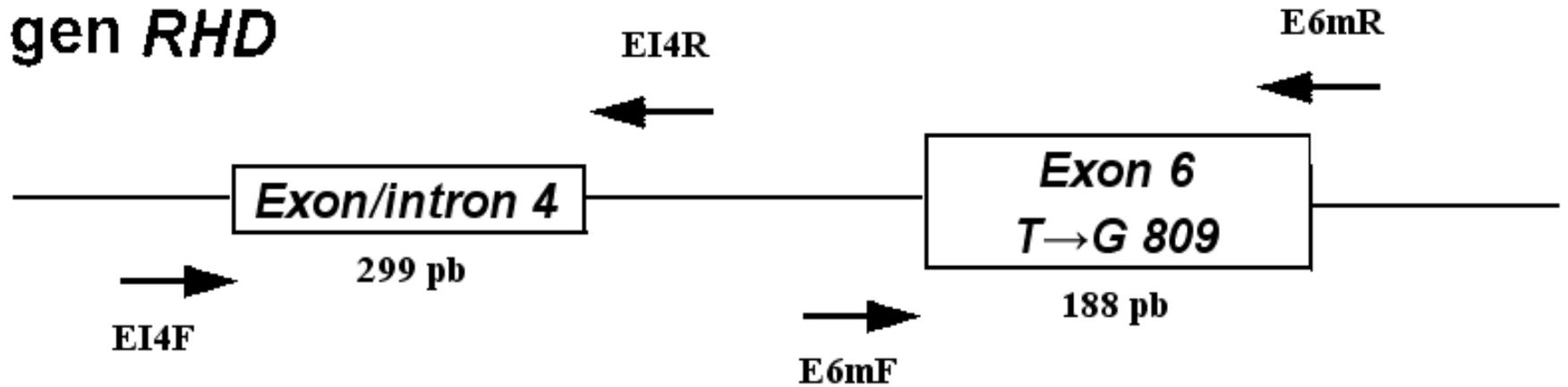
Detección del gen β -globina humana en muestras recolectadas



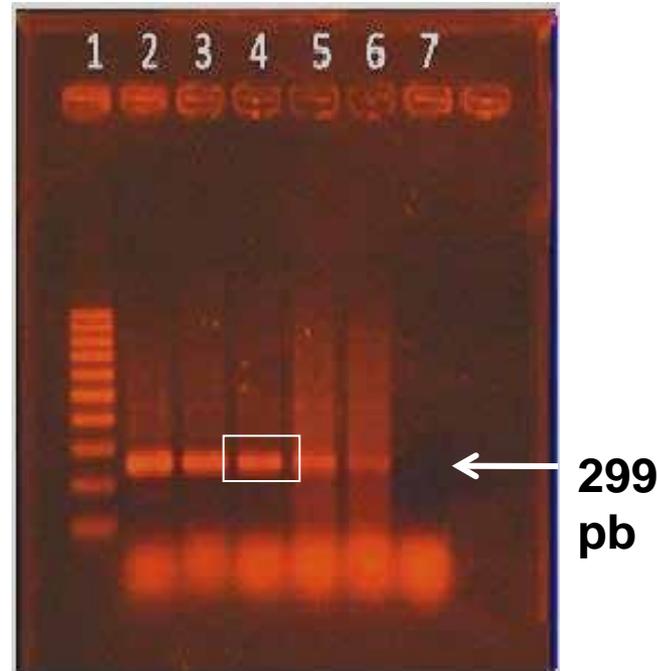
Diseño de los partidores para fenotipo D parcial



Diseño de los partidores para fenotipo D débil tipo I

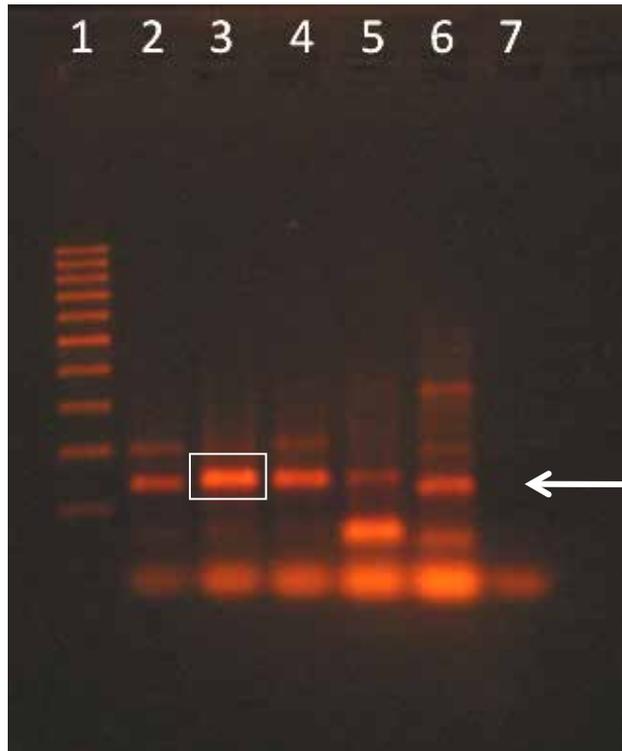


Determinación de la concentración de $MgCl_2$ para cada partidor diseñado



Amplificación del exón/ intrón 4 del gen *RHD* a 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mM de $MgCl_2$

Determinación de la concentración requerida de cada partidor para PCR

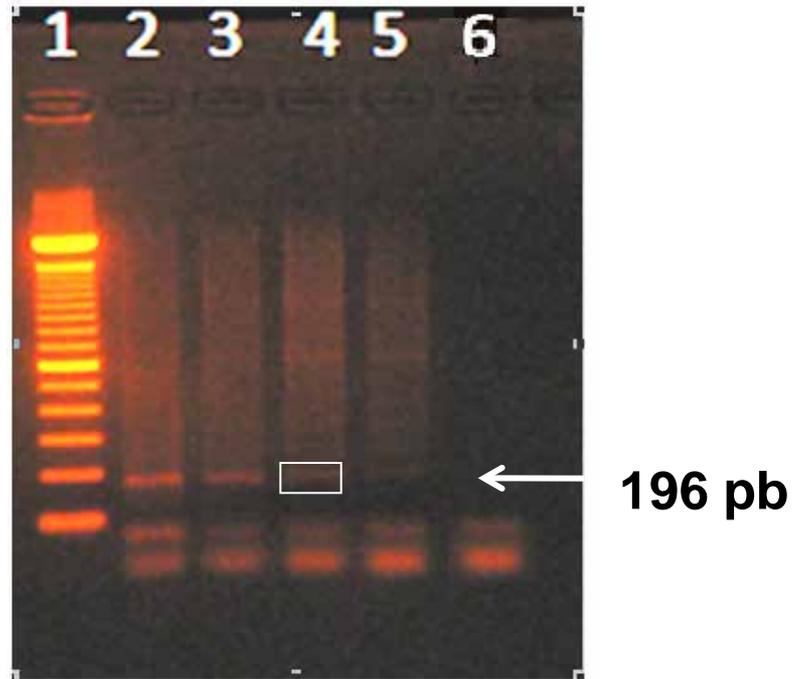


E5F/E5R: 0,4 μ M
E10F/ E10R: 0.4 μ M
EI4F/ EI4R: 0.4 μ M

E6mF/ E6mR: 0.6 μ M
E4F/ E4R: 0.6 μ M

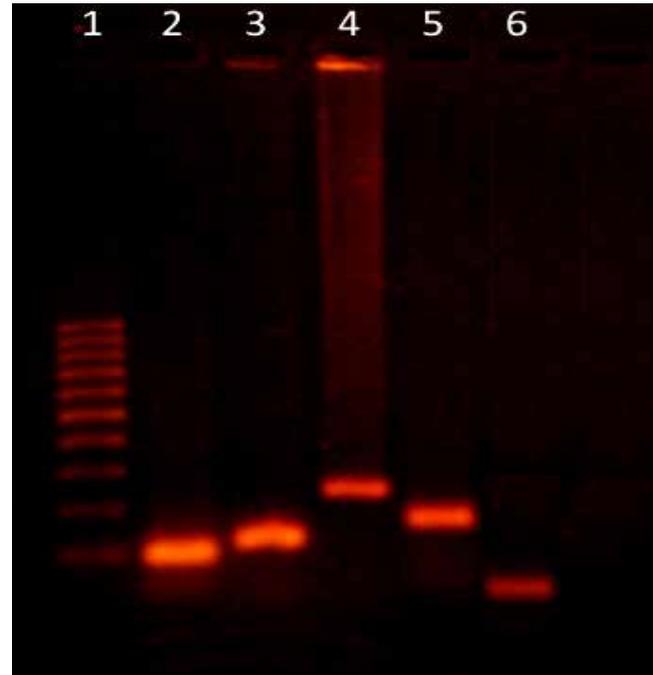
Amplificación del exón 5 del gen *RHD* a
0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 μ M

Determinación de la sensibilidad de la reacción de PCR para cada partidor utilizado



Amplificación del exón 10 del gen *RHD* usando 300, 200, 100 y 50 ng de ADN

Determinación de la especificidad de los partidores para el gen *RHD*



Tamaño Fragmentos Amplificados

Carril 2: exón 4 → 123 pb

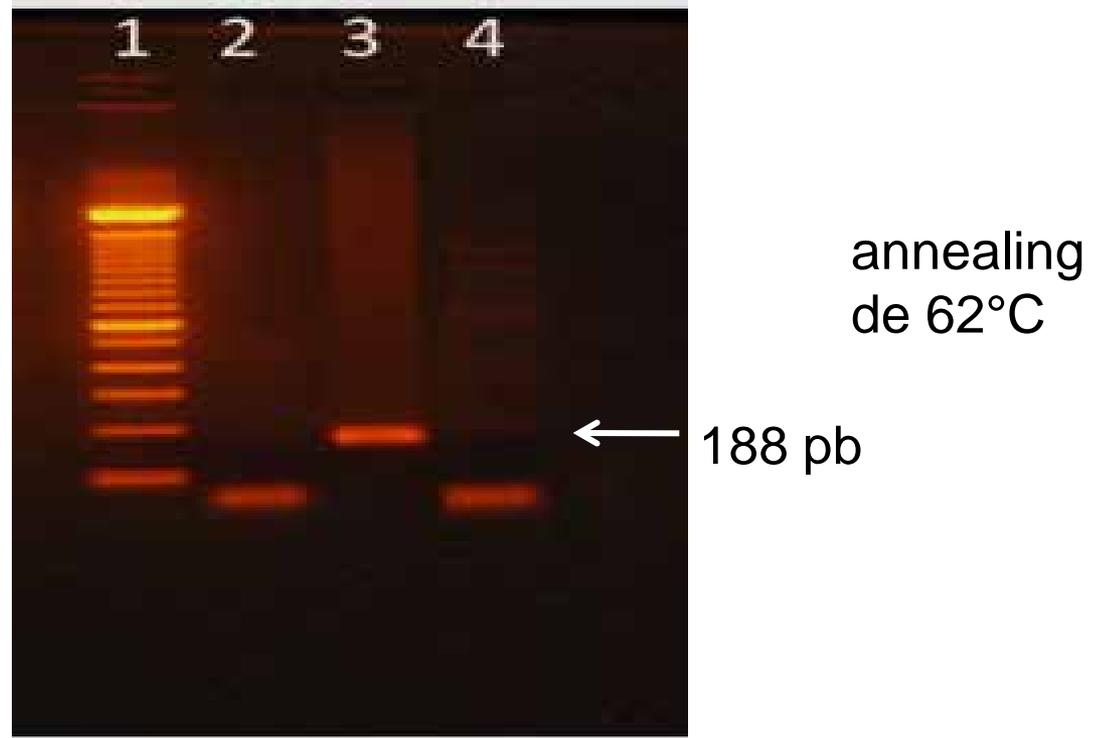
Carril 3: exón 5 → 158 pb

Carril 4: exón-intrón 4 → 299 pb

Carril 5: exón 10 → 196 pb

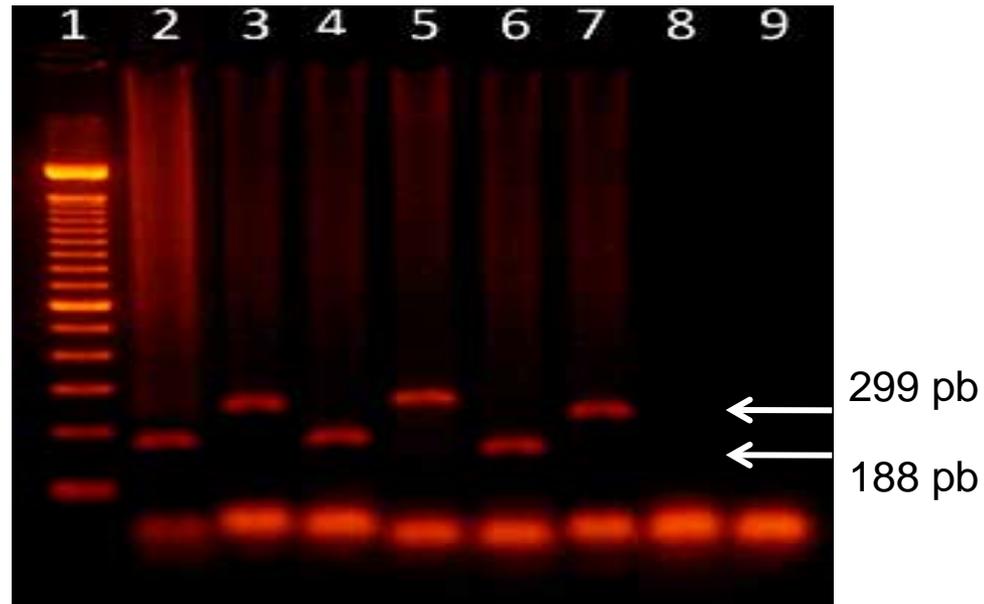
Carril 6: control negativo

Detección de la mutación T→G 809 del fenotipo D débil tipo I



Detección del exón 6 mutado en muestras D débil
y en muestra Rh positivo.

Detección de la mutación T→G 809 del fenotipo D débil tipo I



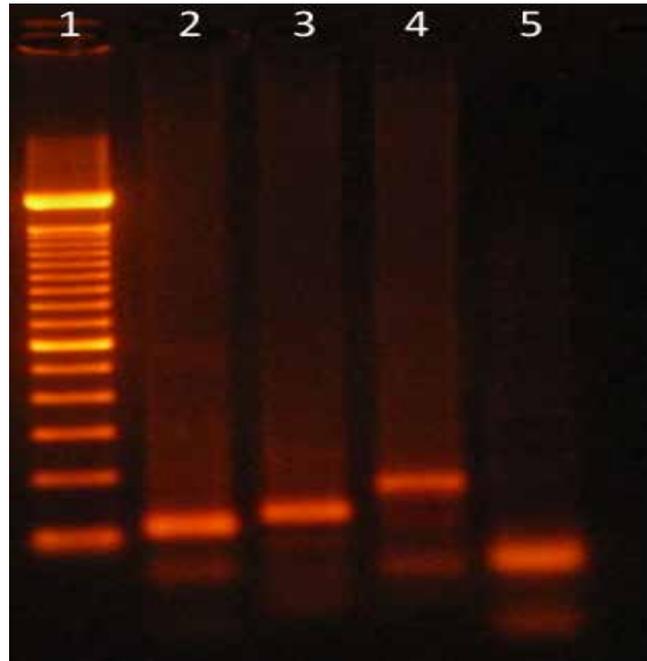
Amplificación del exón 6 mutado y exón-intrón 4 del gen *RHD* en las muestras recolectadas. Carril 2 y 3, muestra 2479; carril 4 y 5, 8847; carril 6 y 7, 3897; carril 8 y 9, controles negativos.

Amplificación de los exones 4, 5 y 10 del gen *RHD*

Diagrama de Exones	Genotipo	Reference
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D ^{IIb}	48
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D ^{IIc}	50
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D ^{IVa}	41
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D ^{IVb}	41
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D ^{Va}	41
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D ^{VcE}	39,40
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D ^{VcE}	40
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DFR	41
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	DBT	49
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D ^{HAR}	35

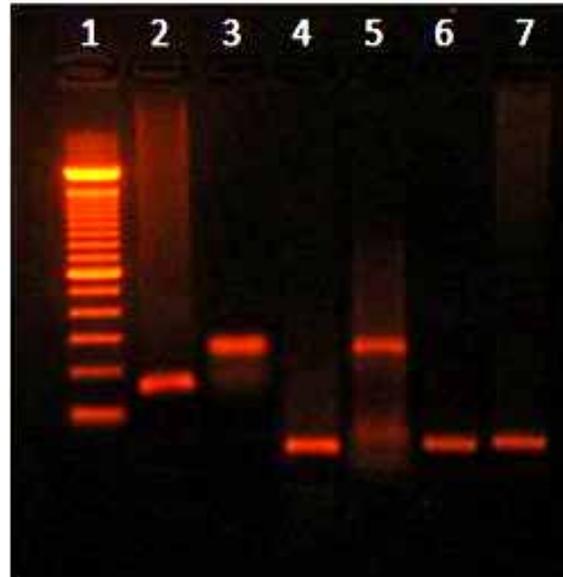
Blood 1997; 89: 2568-77

Amplificación de los exones 4, 5 y 10 del gen *RHD* en la muestra presuntamente D parcial



Carril 1, marcador de peso molecular 100 pb;
Carril 2, exón 4 (123 pb); Carril 3, exón 5
(158 pb); Carril 4, exón 10 (196 pb)

Amplificación del exón 6 mutado y exón-intrón 4 del gen *RHD* en la muestra presuntamente parcial



Detección del exón 6 mutado y del exón-intrón 4 en el gen *RHD* en muestra JCR y en muestra Rh positiva

Discusión

- Si bien el número de muestras recolectadas fueron menos de las esperadas, a partir de la revisión de las fichas clínicas se puede informar que dentro de 2.528 determinaciones de grupo sanguíneo, 50 presentaban fenotipos presuntivos de D débil y/o parcial, lo que representa el 1.9% de las determinaciones realizadas entre el 1 de noviembre del año 2009 al 31 de diciembre del año 2010.
- La identificación por PCR del fenotipo D débil tipo I en las muestras analizadas se correlaciona con la fenotipificación serológica previamente realizada en las 4 muestras Rh negativas con test D^u positivas.

Discusión

- La muestra previamente clasificada como D parcial, pudo serlo probablemente a que provenía de un individuo clasificado como Rh positivo y que poseía anti-D sérico. Con los resultados que permitieron clasificar esta muestra como D débil tipo I, no se descarta la posibilidad de que un criterio así (una inmunización anti-D) se fundamente en la mutación que caracteriza a los fenotipos D débiles tipo 4, 11 y 15, que son los fenotipos débiles que se han relacionado con inmunización anti-D.

Conclusión

1. Se estandarizó una técnica basada en PCR que permite identificar aquellas muestras sanguíneas que presentan un fenotipo Rh discrepante mediante técnicas inmunohematológicas.
2. La tipificación molecular de las muestras con fenotipo D débil y de las muestras Rh discrepantes permitió confirmar el fenotipo como D débil, el que probablemente sea del tipo I.
3. La muestra clasificada como fenotipo D parcial, después de analizarla con esta metodología, fue reclasificada como fenotipo D débil tipo I.

La implementación de la técnica basada en PCR permitiría discriminar entre las muestras con fenotipo RhD débil de las muestras con fenotipo D parcial en aquellas muestras que se presenten como discrepantes para el Banco de Sangre.

La utilización de esta técnica de PCR en los Bancos de Sangre facilitaría la identificación de aquellas muestras o unidades de glóbulos rojos a transfundir que presenten un fenotipo sanguíneo Rh discrepante, disminuyendo los casos de pacientes que pueden generar una inmunización primaria contra el antígeno D, y también disminuyendo las reacciones hemolíticas transfusionales en pacientes que ya se encuentran inmunizados.

Proyecciones

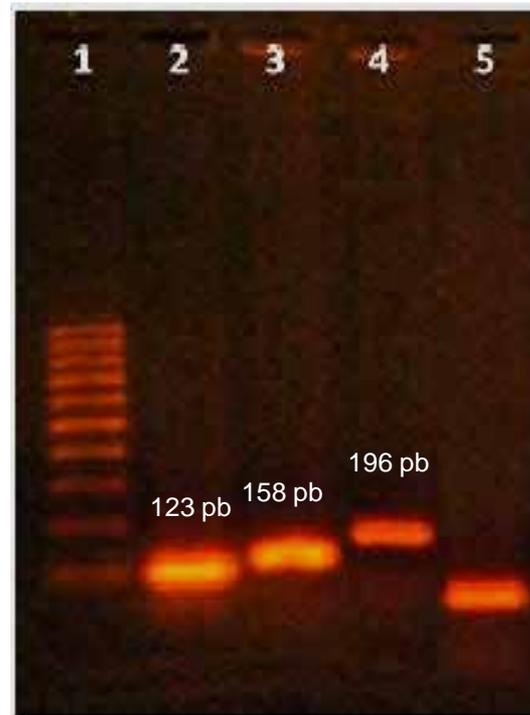
- Estimar la frecuencia de los fenotipos D débiles y de los fenotipos D parciales presentes en nuestra población.
- PCR múltiplex dirigida a la amplificación de un mayor número de exones del gen *RHD*.
- Realizar PCR múltiplex para determinar la causa más frecuente de la expresión reducida del antígeno D.
- Someter a los fragmentos amplificados a digestión con enzimas de restricción.
- Secuenciación del gen *RHD*.

Back ups

Reclasificación sanguínea de las muestras

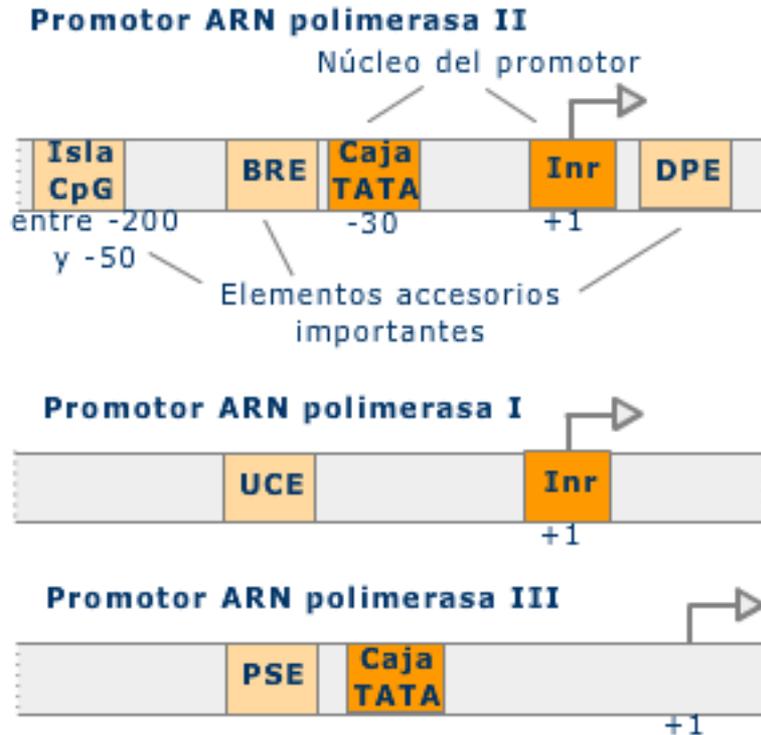
Muestra	Anti-D	Anti-C	Anti-E	Anti-c	Anti-e	Genotipo probable	Grupo sanguíneo
734	-	-	+	2+	2+	DcE/dce	A+
8847	-	-	+	2+	+	DcE/dce	O+
PAV	-	-	4+	4+	4+	DcE/dce	O+
A1	-	-	-	3+	2+	Dce/dce	O+
1972	-	-	-	4+	3+	Dce/dce	A+
2479	-	+	-	+	+	DCe/dce	A+
3897	-	2+	-	4+	3+	DcE/dCe	O+

Amplificación de los exones 4, 5 y 10 en muestra 734



Fragmentos amplificados de los 3 exones en muestra 734

Preguntas para la profe



SINERGISMO ENTRE TATA e Inr según distancia que los separe. Como esta en la imagen hay sinergismo y más alejados entre ellos actúan independientemente.

DPE es un promotor dentro del gen.

Mutaciones en la región promotora repercuten en una expresión reducida de la proteína o se generan proteínas truncadas ?