

12

Congreso Colombiano **Acobasmet**
de Bancos de Sangre y Medicina
Transfusional
Congreso Iberoamericano **GCIAMT**

*Nuevamente juntos, innovando
para fortalecer capacidades*



Serología y Biología Molecular: obligadas a entenderse

Prof. Dr. Carlos Cotorruelo

Laboratorio de Inmunohematología

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

IDICER - CONICET

Hemaglutinación ➡ **“gold standard”** ➡ Sencilla - Económica
Específica - Sensible

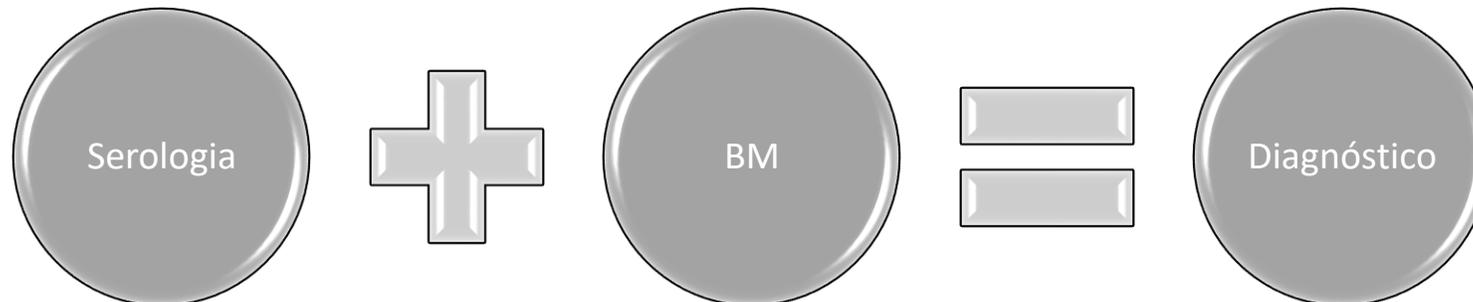
Limitaciones

- ▶ Caracterizar el fenotipo D variante del Sistema Rh
- ▶ Tipificar eritrocitos que poseen expresión alterada de antígenos (variantes Fy^b)
- ▶ Determinar fenotipos eritrocitarios en pacientes recientemente transfundidos
- ▶ Tipificar antígenos eritrocitarios en pacientes con CD+
- ▶ Escasez de reactivos potentes para algunos antígenos clínicamente significativos (Di, Yt, Co)

Biología Molecular ➡ **“complemento de la serología”** ➡ permite resolver las limitaciones
planteadas por la hemaglutinación

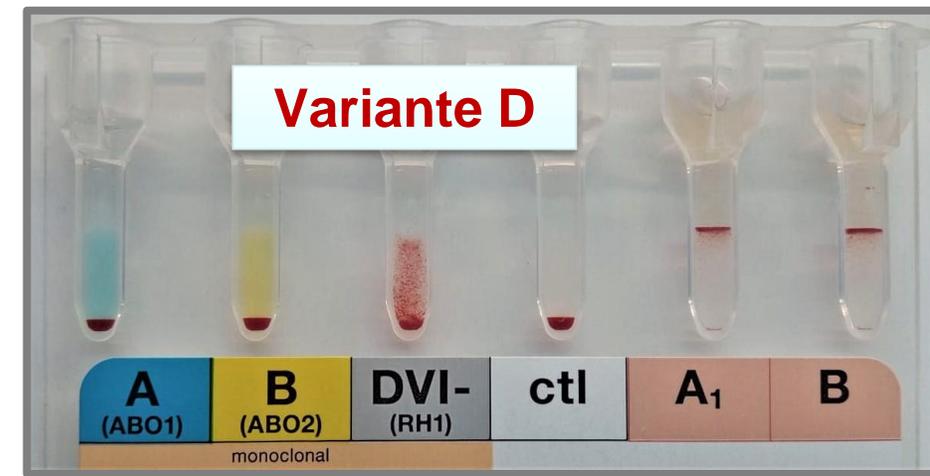
Limitaciones

- ▶ Inferir fenotipos a partir de la determinación de genotipos



Gestante

- **Paciente:** mujer de 30 años
- **Diagnóstico:** embarazo
- **Solicitud:** rutina inmunohematológica del primer trimestre



Inmunohematología
básica y aplicada
Primera edición

Cortés, A.
Muñiz-Díaz, E.
León, G.

CAPÍTULO 22

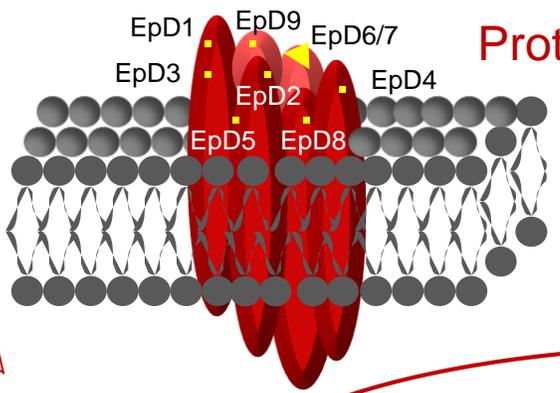
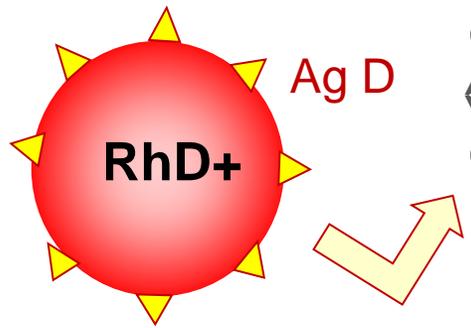
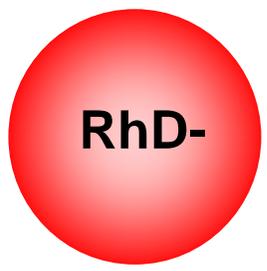
Control inmunohematológico de la gestante

EDUARDO MUÑIZ-DÍAZ*

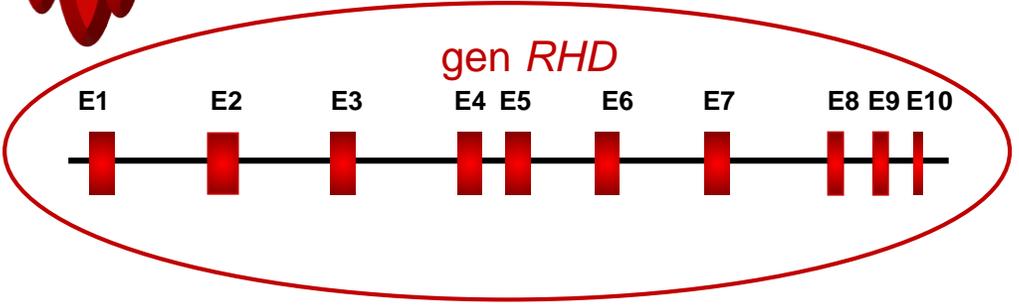
- Si la aglutinación obtenida no se corresponde con la que habitualmente presentan las muestras RhD positivas, **se recomienda catalogar la muestra de forma provisional como RhD negativa**, hasta que un **laboratorio de referencia** determine definitivamente su carácter RhD positivo o RhD negativo.

- Los profesionales implicados en el programa de profilaxis antenatal deben informar a la embarazada o a su médico tratante que es portadora de un grupo RhD negativo y, como tal, candidata al tratamiento con IgG anti-D de acuerdo con el calendario previsto.

Variantes D



Proteína RhD



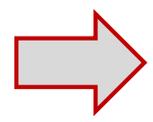
Mecanismos moleculares



Cambio de nucleótidos



>400 **alelos** descritos para el gen *RHD*



Cambio de **AAs** en la Proteína RhD

Fenotipo D variante

alelos D débiles

alelos D parciales

Fenotipo D negativo

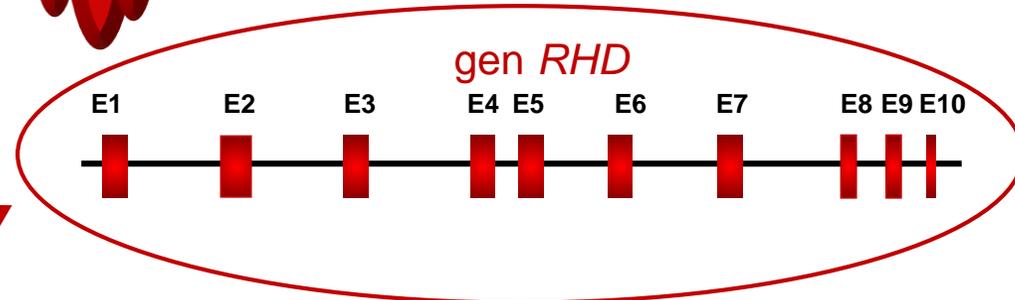
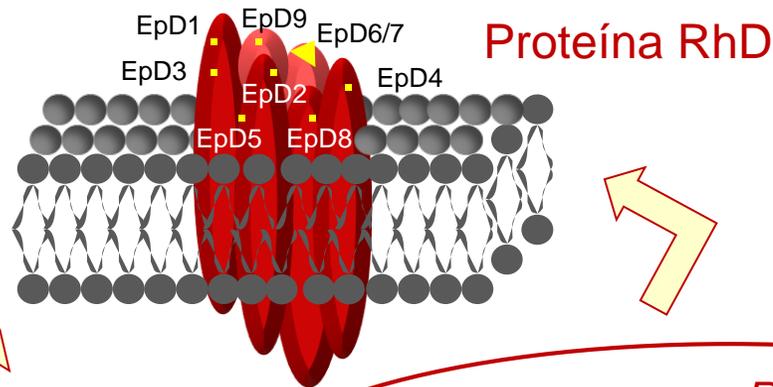
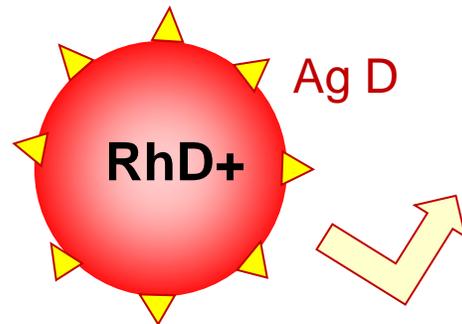
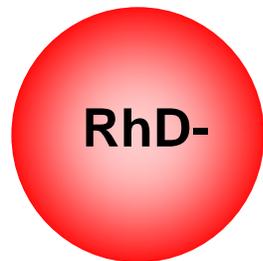
alelos nulos

alelos DEL

Fenotipo D positivo

alelos D parciales

Variantes D



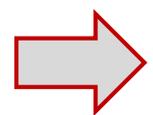
Mecanismos moleculares



Cambio de nucleótidos



>400 **alelos** descriptos para el gen *RHD*



Cambio de **AAs** en la Proteína RhD

Fenotipo D variante

- alelos D débiles
- alelos D parciales

Fenotipo D negativo

- alelos nulos
- alelos DEL

Fenotipo D positivo

- alelos D parciales



Evidencias clínicas

- D débil tipo 1
 - D débil tipo 2
 - D débil tipo 3
 - D débil tipo 4.0 y 4.1
- } no producen anti-D clínicamente significativo

> Transfusion. 2020 Apr;60(4):855-859. doi: 10.1111/trf.15741. Epub 2020 Mar 12.

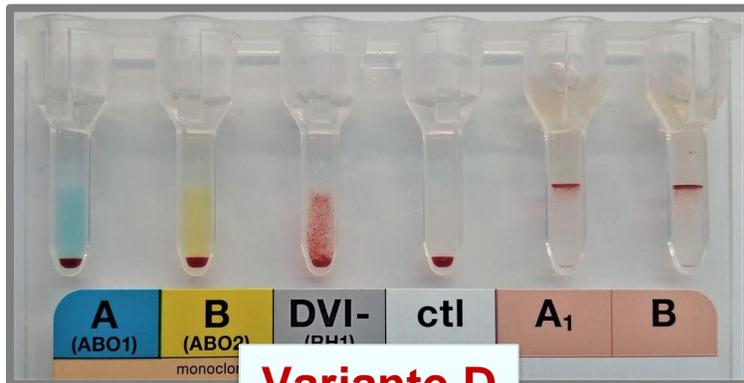
It's time to phase out "serologic weak D phenotype" and resolve D types with RHD genotyping including weak D type 4

Willy A Flegel ^{1,2}, Gregory A Denomme ³, John T Queenan ⁴, Susan T Johnson ⁵, Margaret A Keller ⁶, Connie M Westhoff ⁷, Louis M Katz ⁸, Meghan Delaney ⁹, Ralph R Vassallo ¹⁰, Clayton D Simon ¹¹, S Gerald Sandler ¹

Receptor
Gestante ayuda a decidir la conducta transfusional u obstétrica

Frecuencia

[D débil tipo 1
D débil tipo 2
D débil tipo 3] ~ 93%



BM



Desarrollos "in house"
Equipos comerciales

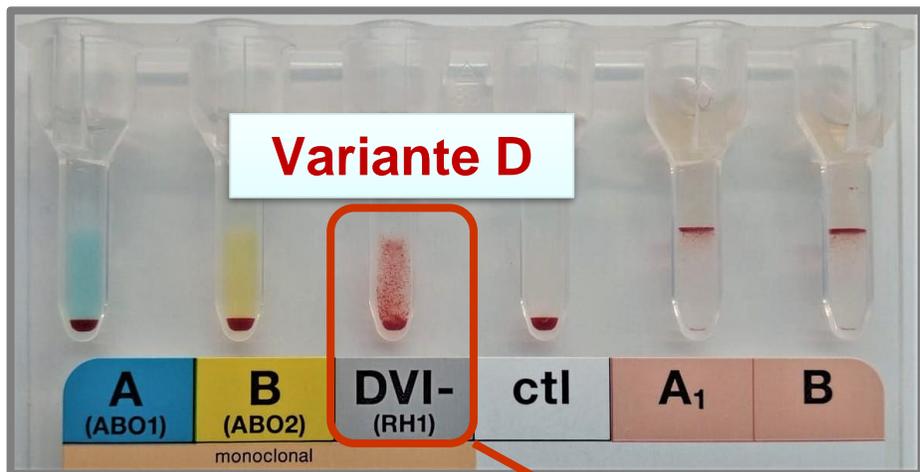
D débil tipo 1
D débil tipo 2
D débil tipo 3
D débil tipo 4

identificar

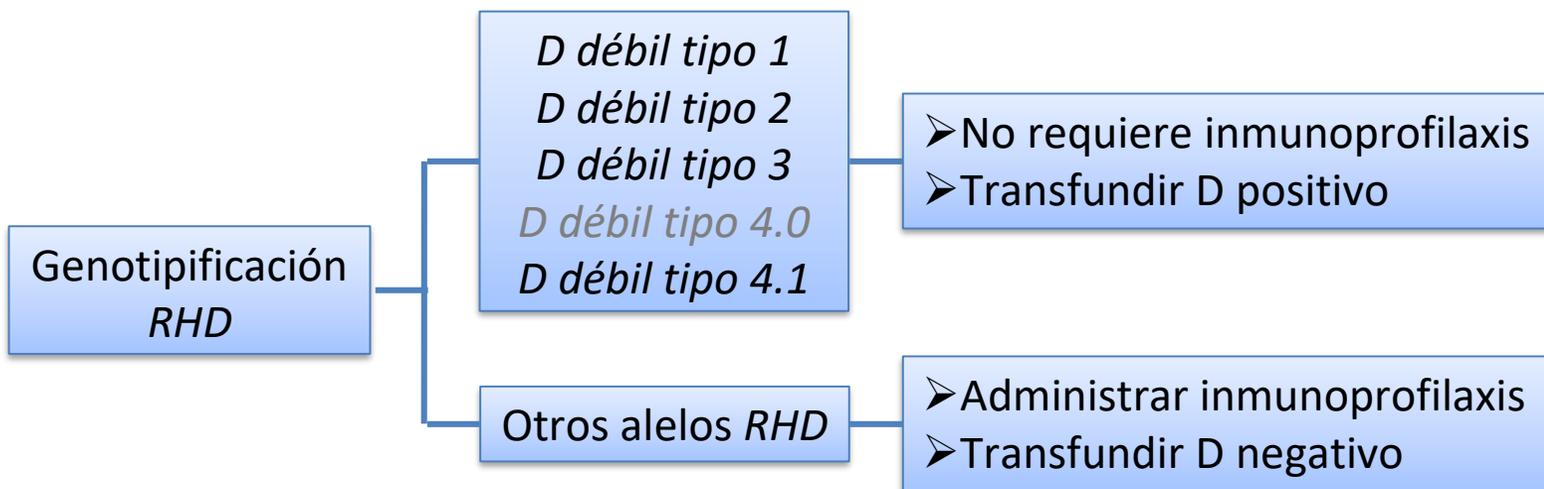
No producen anti-D de importancia clínica

Susceptible de aloinmunización anti-D

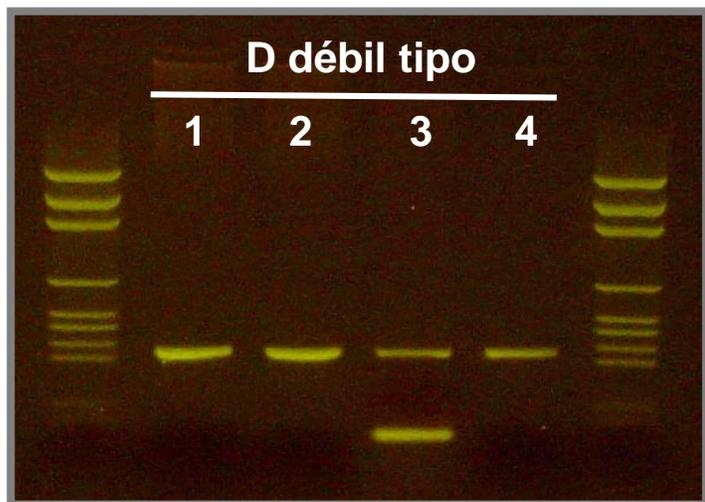
Serología



Biología Molecular



Resultado



El resultado del estudio molecular debe ser interpretado en el contexto de la información serológica disponible.

Alelo *RHD*: *RHD***D* débil tipo 3

Fenotipo D débil

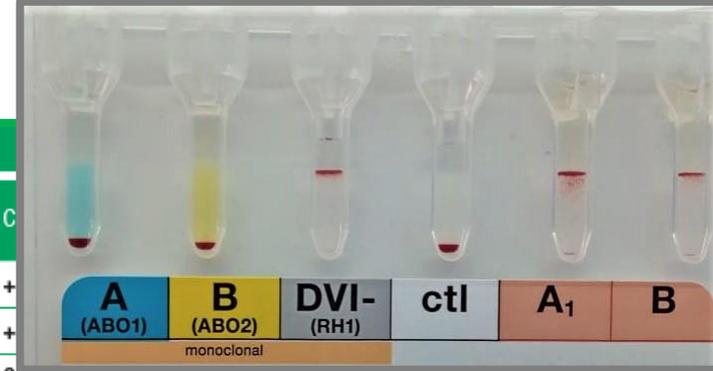
Paciente

- **Paciente:** hombre de 75 años
- **Diagnóstico:** cirugía por infección protésica de cadera
- **Antecedentes:** transfundido

Estudios pretransfusionales:

- Grupo sanguíneo: O positivo
- Ac. Irregulares: positivo
- Prueba de Coombs Directa: negativa
- Fenotipo Rh: C+ c- E- e+ (R₁R₁)
- Se detecta anti-E + anti-D ?
- Autocontrol: negativo

Rh-hr	Möglicher Genotyp Probable Genotype Genotype probable Probabile genotipo Genotipo probable Genótipo provável	Spender Donor Donneur Donatore Donante Dador	D	C	MNS						Luth.		Xg	
					M	N	S	s	Lu ^a	Lu ^b	Xg ^a	♀ ♂		
1	CCC ^w D.ee	R ₁ ^w R ₁	725669	+	+	+	0	+	+	0	+	+	N/A	
2	CCD.ee	R ₁ R ₁	749231	+	+	+	0	+	+	0	+	+	N/A	
3	ccD.EE	R ₂ R ₂	608483	+	0	+	+	0	+	0	+	+	N/A	
4	Ccddee													
5	ccddEe													
6	ccddee													
7	ccddee													
8	ccD.ee													
9	ccddee													
10	ccddee													
11	ccddee													

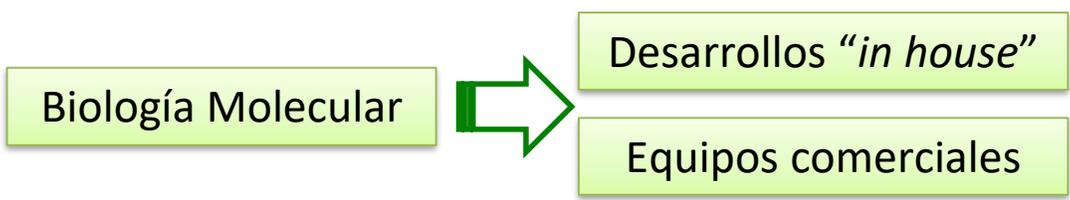



Adsorciones diferenciales:

Células 1 O R₁R₁ MMss P₁ K- Le(a-b+) Fy(a-b-) Jk(a+b-)
 Células 2 O r^wr NNSS P₁ K- Le(a-b+) Fy(a-b+) Jk(a-b-)

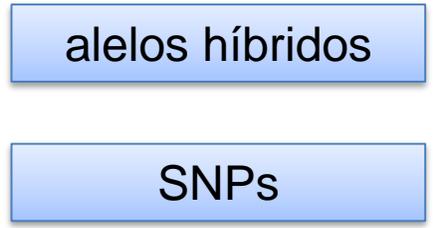
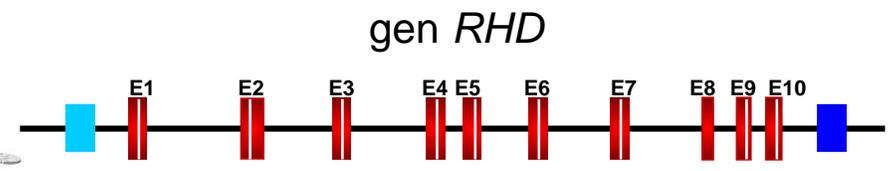
Células	Suero adsorbido
1	anti-E
2	anti-D

D parcial? anti-LW?



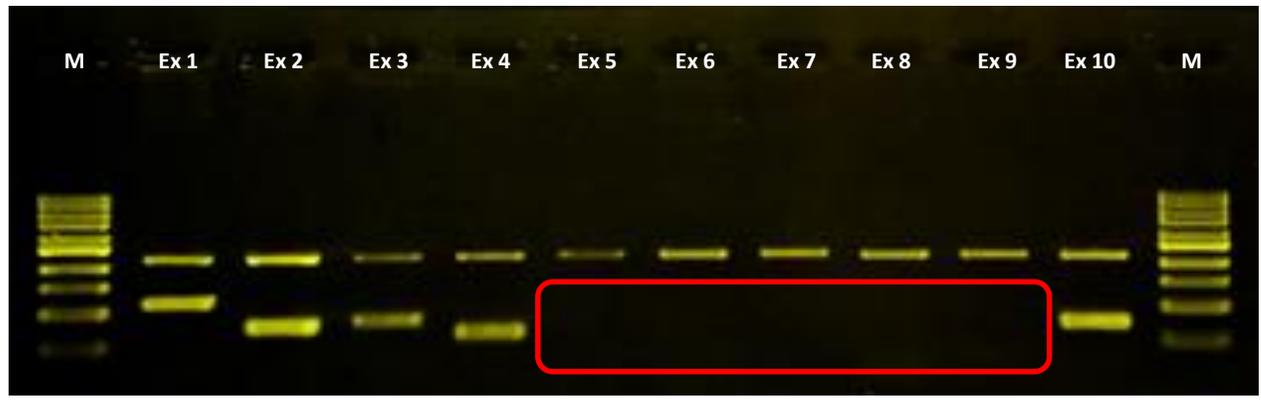
Alelos D parciales

Biología Molecular
Polimorfismos en los
exones *RHD*



D parcial

Resultado



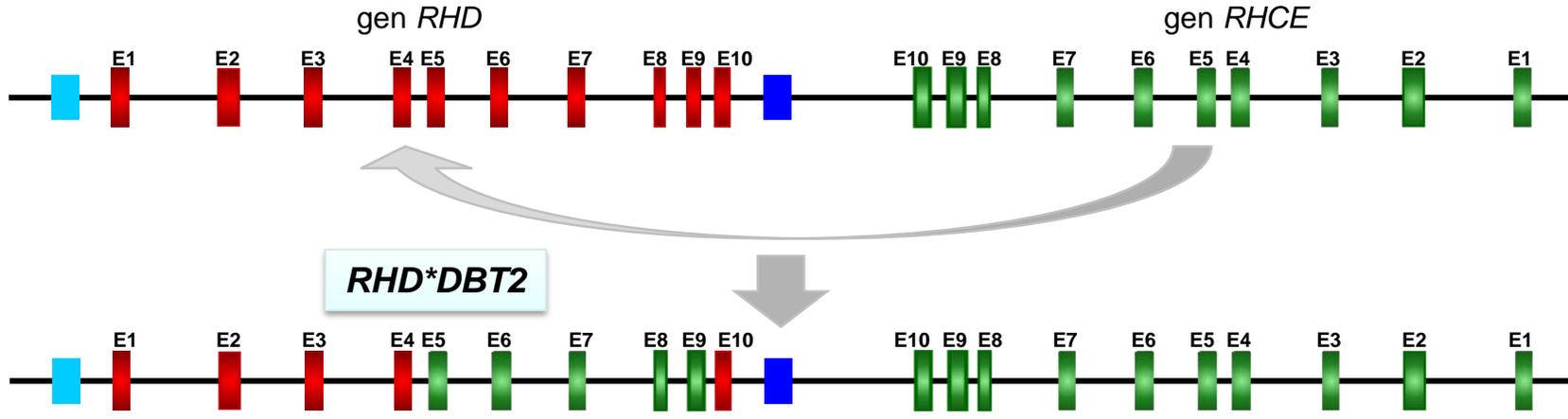
Ausencia de exones 5-9 del gen *RHD*

Alelo *RHD*: *RHD*DBT2*

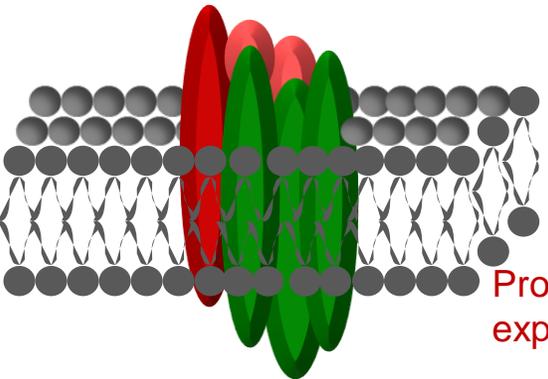
Fenotipo D parcial: DBT

¿Cómo es la reactividad del fenotipo D parcial DBT con los reactivos anti-D de uso rutinario?

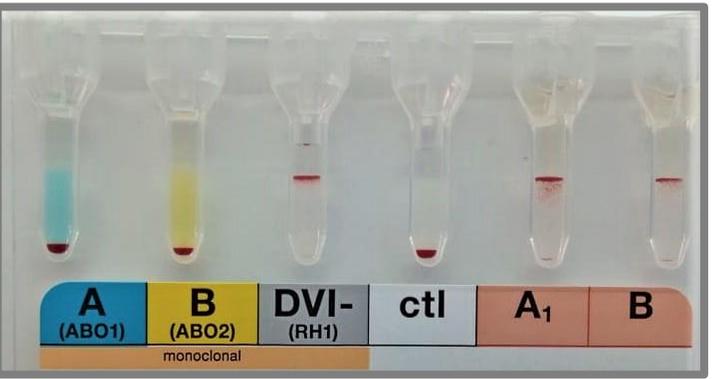
Fenotipo DBT



Locus RH



El resultado del estudio molecular debe ser interpretado en el contexto de la información serológica disponible.



Br J Haematol. 1996 Jun;93(3):720-7.

The genetic basis of a new partial D antigen: DDBT.

Beckers EA, Faas BH, Simsek S, Overbeeke MA, van Rhenen DJ, Wallace M, von dem Borne AE, van der Schoot CE. Red Cross Blood Bank Rotterdam, The Netherlands.

Abstract

The Rh system, the most polymorphic system on red cells, is genetically controlled by two different but highly homologous genes on chromosome 1. The RHCE gene encodes different RhCcEe polypeptides and the RHD gene encodes D antigens. It is well established that in D negative individuals the RHD gene is either absent or grossly deleted. The D antigen comprises at least nine serologically defined D epitopes. The D antigen can be divided into different partial D categories, reflecting a different pattern of specific D epitopes. In this study a newly defined partial D antigen, DDBT, was studied. D epitope mapping revealed the presence of D epitopes 6/7 and 8 and the absence of the other D epitopes. The molecular basis of this phenotype was studied by Southern blotting, by RHD typing using the polymerase chain reaction (RHD-PCR) and by sequence analysis of Rh transcripts. The DBT phenotype appeared to be encoded by a hybrid RHD gene, in which exons 5, 6 and 7 (and possibly the identical exon 8) were replaced by the corresponding exons of the RHCE gene. From this study it may be concluded that D epitopes 1, 2, 3, 4, 5 and 9 are dependent on the presence of RHD exons 5, 6, and 7.

patrón de aglutinación normal con la mayoría de los anti-D comerciales

Biología
Molecular



No se detectó un alelo *RHD* parcial

- ▶ Es un fenotipo D parcial pero el alelo responsable no fue interrogado
- ▶ No es un fenotipo D parcial

Fenotipo Fy(a-b-)

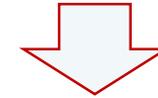
Paciente



¿Cómo transfundirlo?



Donante



¿Es un fenotipo nulo?

Fy nulo en la línea eritroide

- Frecuente en individuos afrodescendientes
- Expresan antígeno Fy^b en otras células del organismo
- No producen anti-Fy^a ni anti-Fy^b
- No requieren unidades Fy(a-b-)

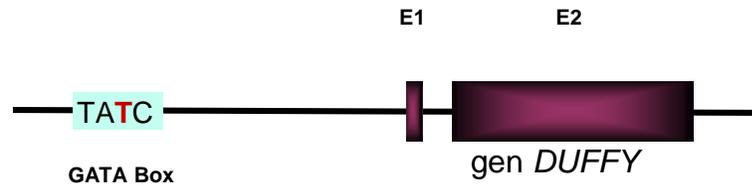
Fy nulo en todas las células del organismo

- Fenotipo raro
- No expresan antígenos Duffy en ninguna célula
- Producen anti-Fy^a
- Requieren unidades Fy(a-b-)

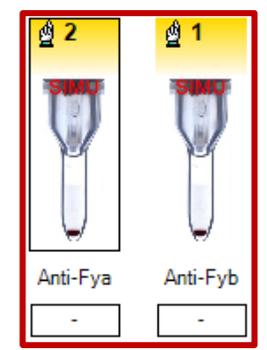
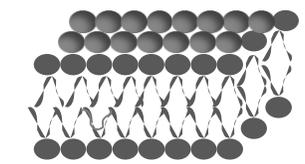
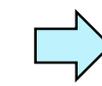
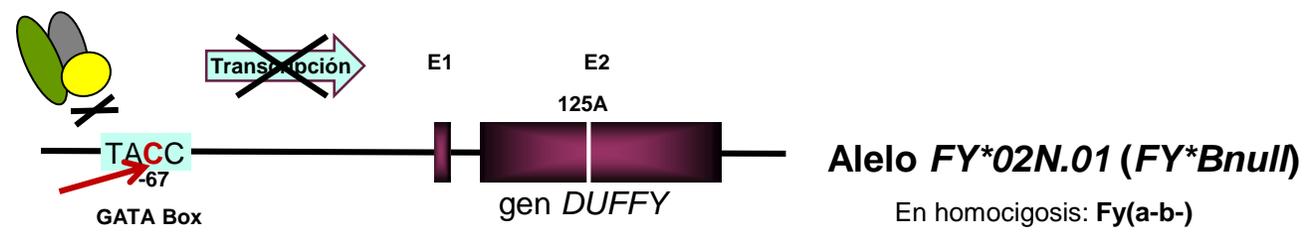
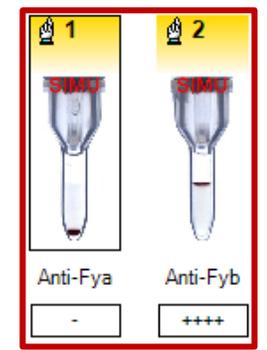
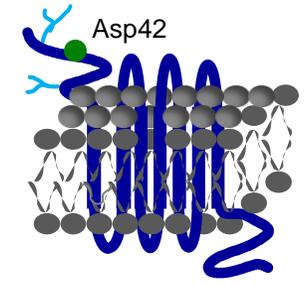
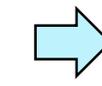
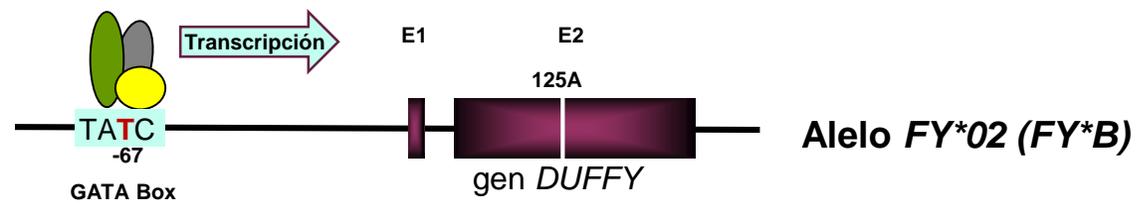
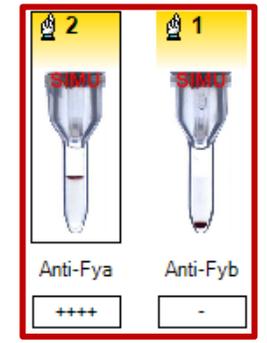
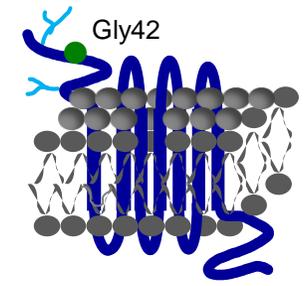
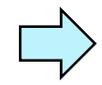
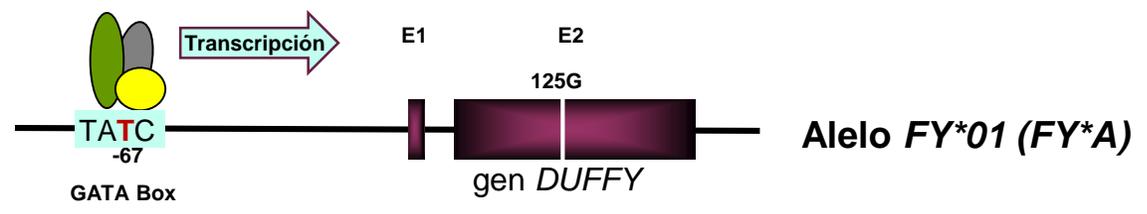
Fy^b muy débil

- El antígeno Fy^x resulta de una expresión débil de Fy^b

Alelos *FY*



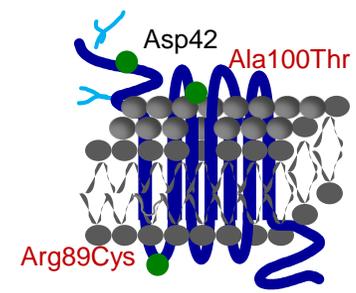
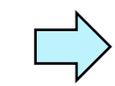
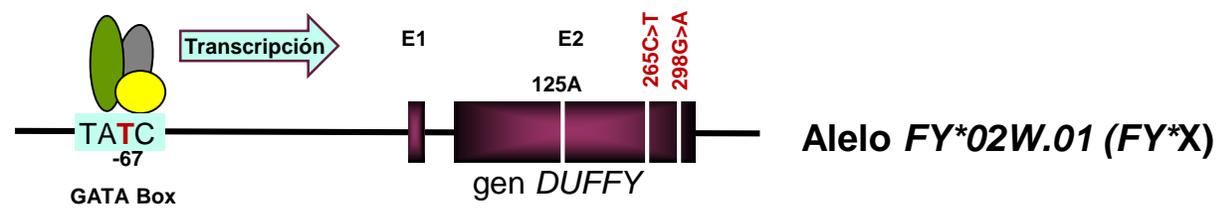
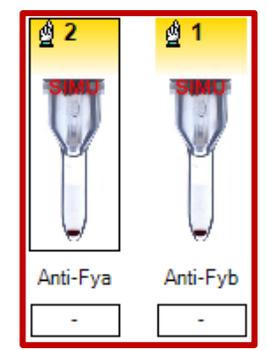
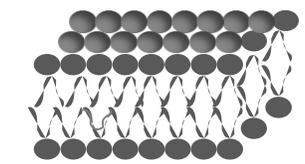
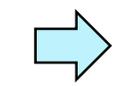
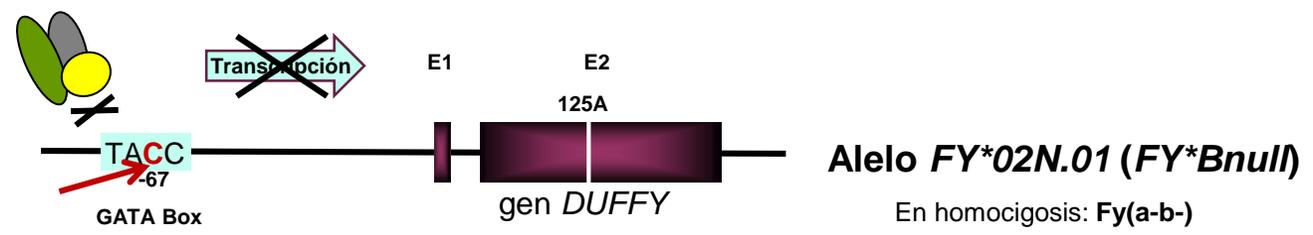
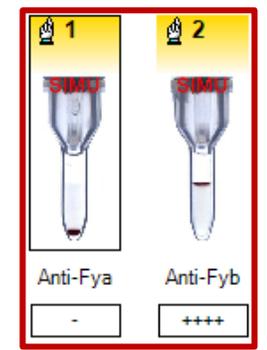
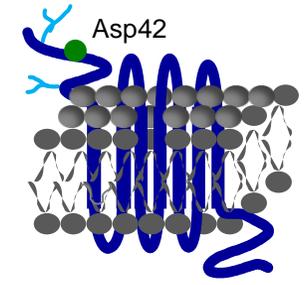
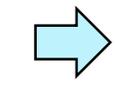
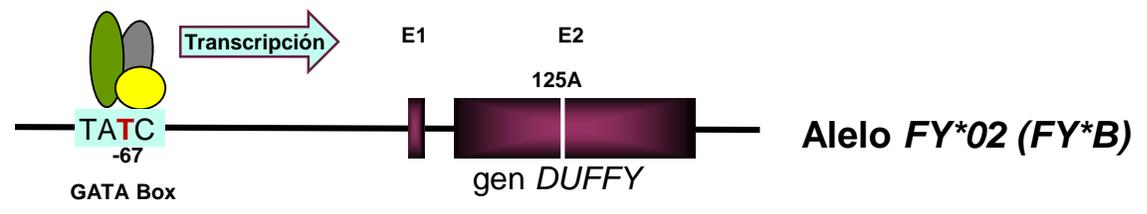
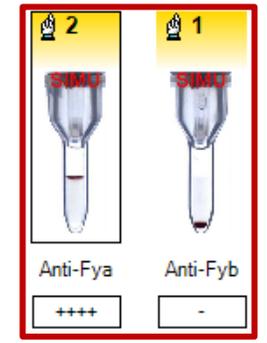
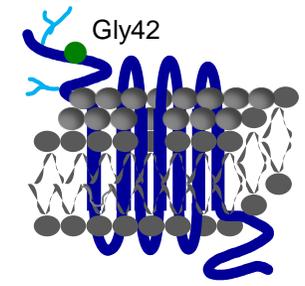
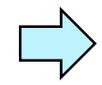
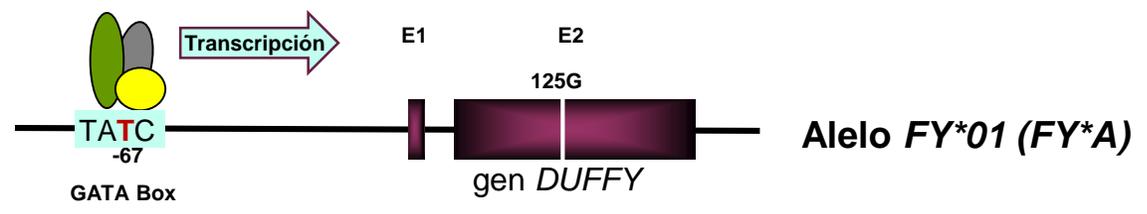
Alelos *FY*



Alteración en la unión de FT

Fenotipo	Genotipo	Compatible
Fy(a-b-)	<i>FY*02N.01/FY*02N.01</i>	Fy(a-b+)
Fy(a+b-)	<i>FY*A/FY*02N.01</i>	Fy(a+b+); Fy(a-b+)
	<i>FY*A/FY*A</i>	Fy(a+b-)

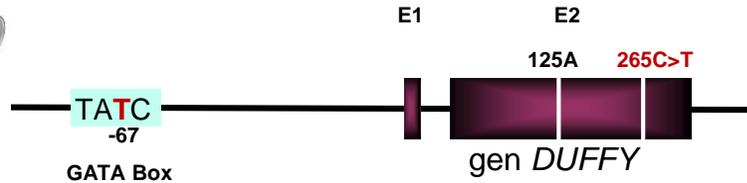
Alelos *FY*



Alteración en la unión de FT



Biología Molecular
Alelos FY



- $FY^{*01} = FY^{*A}$
- $FY^{*02} = FY^{*B}$
- $FY^{*02N.01} = FY^{*Bnull}$
- $FY^{*02W.01} = FY^{*X}$

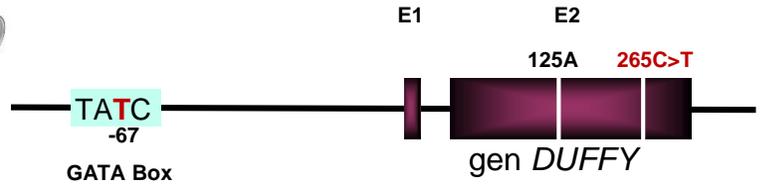


Fenotipo	Genotipo	Compatible	Donante
Fy(a-b-)	$FY^{*02N.01}/FY^{*02N.01}$	Fy(a-b+)	Fy(a-b-)
	$FY^{*02N.01}/FY^{*02W.01}$		Fy(a-b+)
	$FY^{*02W.01}/FY^{*02W.01}$		Fy(a-b+)

Fy nulo en la línea eritroide



Biología Molecular
Alelos FY



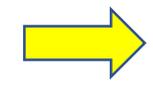
- FY*01 = FY*A
- FY*02 = FY*B
- FY*02N.01 = FY*Bnull
- FY*02W.01 = FY*X



Genotipo
FY*A/FY*B



Fenotipo inferido
Fy(a+b+)



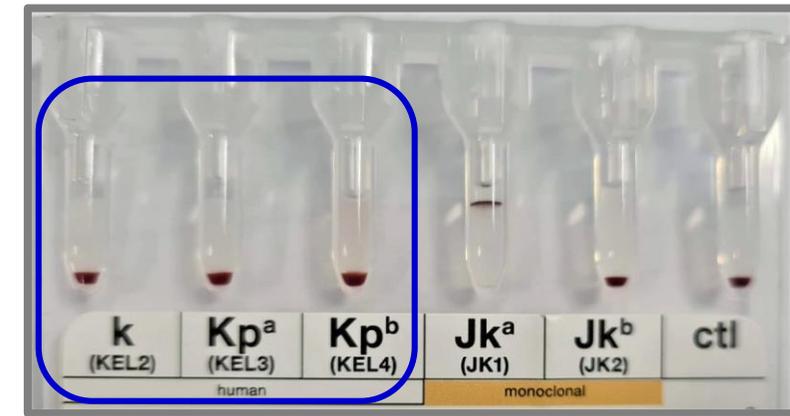
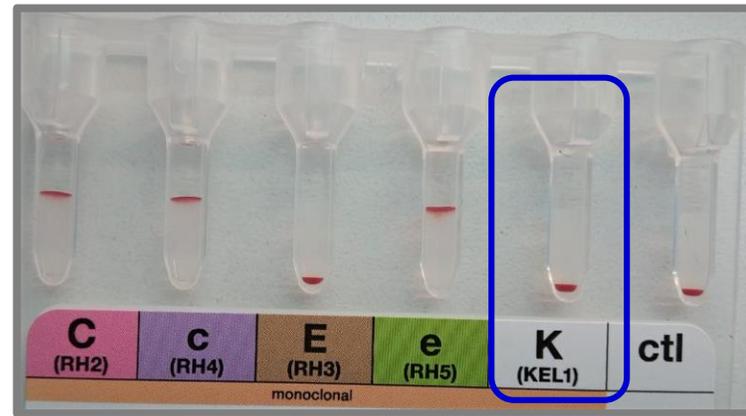
Discrepancia
fenotipo - genotipo

Fenotipo	Genotipo	Compatible	Donante
Fy(a-b-)	Mutaciones en FY*01 y FY*02	Fy(a-b-)	Fy(a-b-)

Fy nulo en todas las células del organismo

El resultado del estudio molecular debe ser interpretado en el contexto de la información serológica disponible.

Fenotipo Kell nulo



Fenotipo K₀

- Falta de expresión de los antígenos del sistema KEL
- Producen anti-Ku (anti-KEL5)

Fenotipo K_{mod}

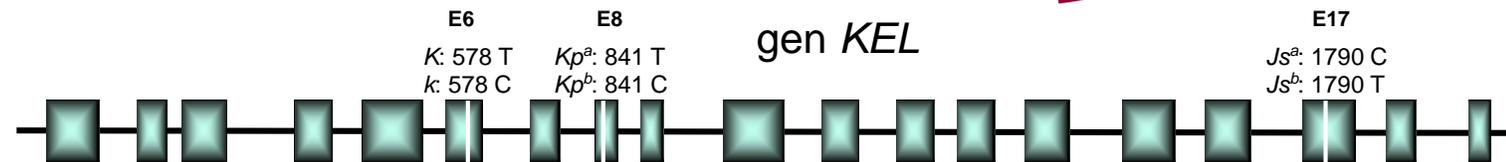
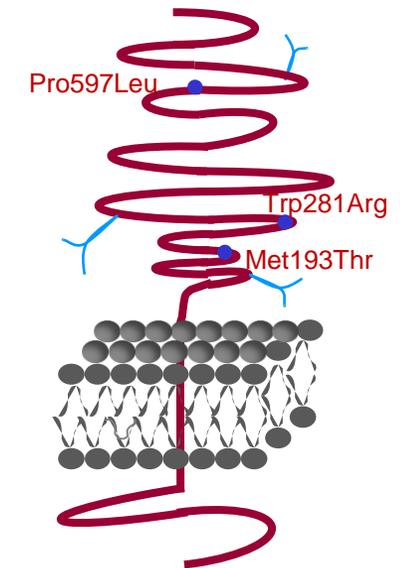
- Expresión débil de los antígenos del sistema KEL



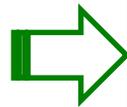
Buscar alelos nulos



Buscar SNVs



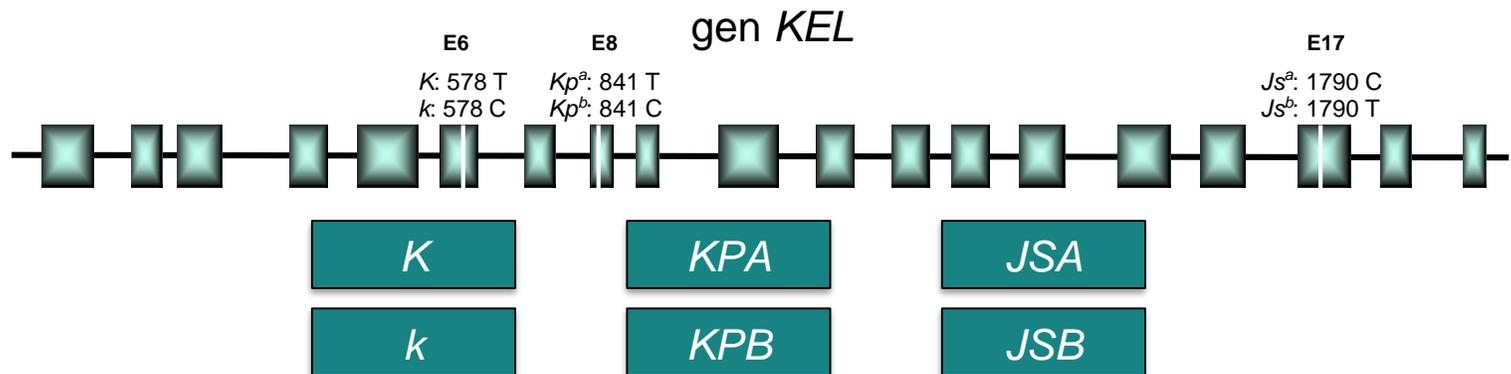
Biología Molecular



Desarrollos "in house"

Equipos comerciales

Genotipificación KEL



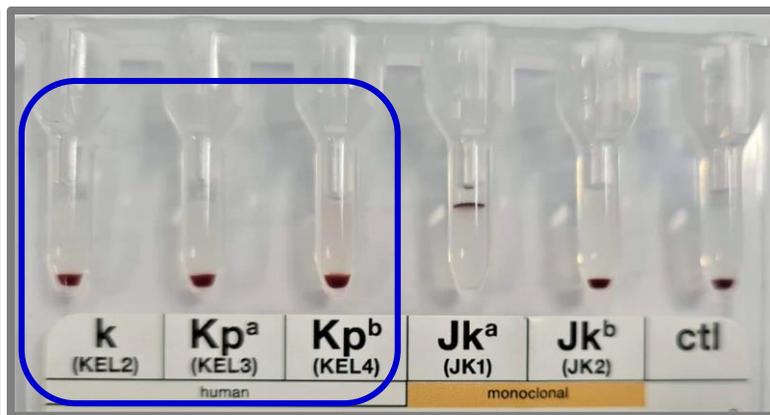
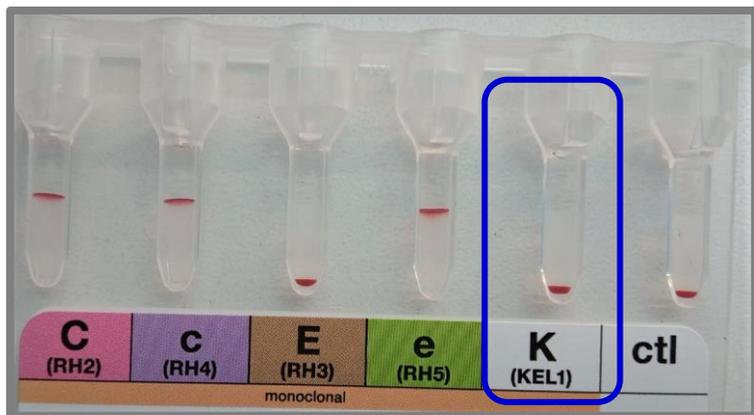
Alelos hallados:
k KPB JSB



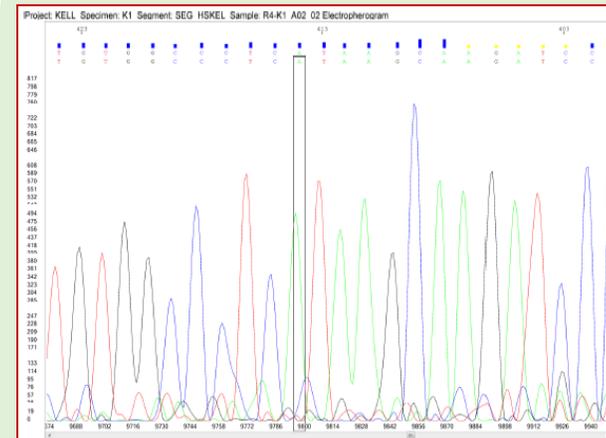
Fenotipo inferido:
kk Kp(a-b+) Js(a-b+)



Discrepancia
fenotipo-genotipo



Secuenciación del gen *KEL*



mutación hallada:
IVS3+1g>a

*KEL*02N.06*



Fenotipo **K₀**



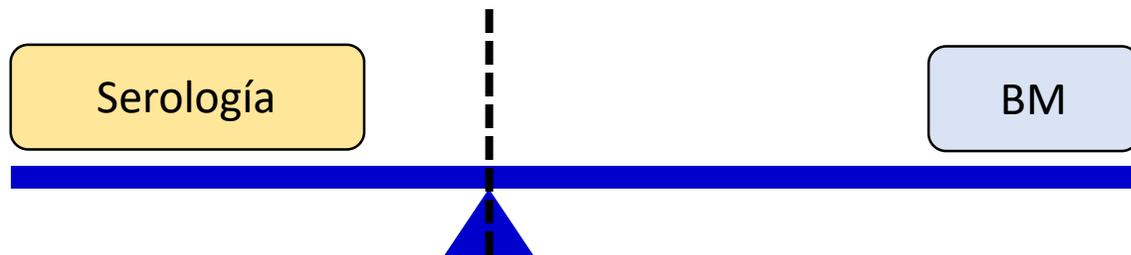
Los GRs no expresan
la glicoproteína Kell



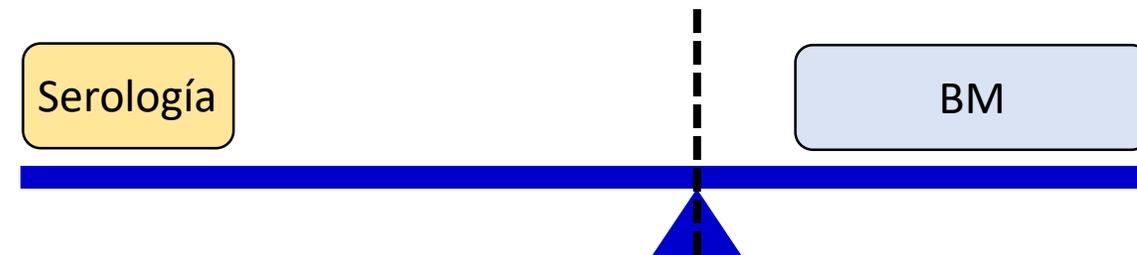
Técnicas serológicas
Técnicas moleculares

- identificar variantes antigénicas
- identificar fenotipos raros
- resolver resultados serológicos inusuales
- investigar anticuerpos
- buscar donantes compatibles.

#optimizarrecursos



#optimizarrecursos



➤ La aplicación de la Biología Molecular en el campo de la Inmunohematología requiere del conocimiento de las **bases moleculares** de los grupos sanguíneos y del **comportamiento serológico** de sus antígenos y anticuerpos.

➤ **Los resultados del estudio molecular deben ser interpretados en el contexto de la información serológica disponible.**

muchas gracias