



**13° CONGRESO COLOMBIANO &  
19° CONGRESO IBEROAMERICANO DE  
BANCOS DE SANGRE, MEDICINA  
TRANSFUSIONAL Y TERAPIA CELULAR**

—  **CONECTADOS CON EL PACIENTE**  —

Octubre 31 a Noviembre 3 del 2024  
Bogotá Colombia, Hotel Sheraton

# Fenotipo y Genotipo del Sistema Sanguíneo Rh

Dra. María Antonieta Núñez Ahumada MSc PhD

Banco de Sangre Clínica Santa María

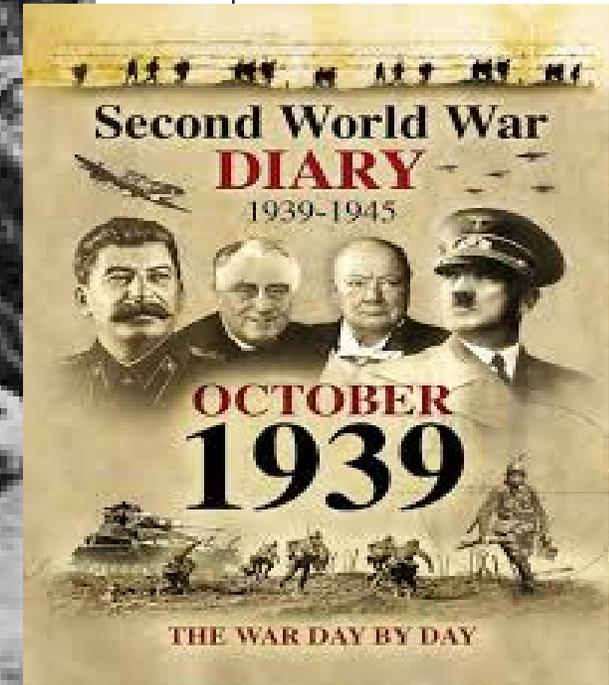
Directora Postítulo en Inmunohematología Avanzada

Universidad Diego Portales

# 1939: se inicia la historia del Sistema Rh...



al del



**CONEJO**



1903 1915 1927  
1939 1951 1963  
1975 1987 1999  
2011 2023 2035

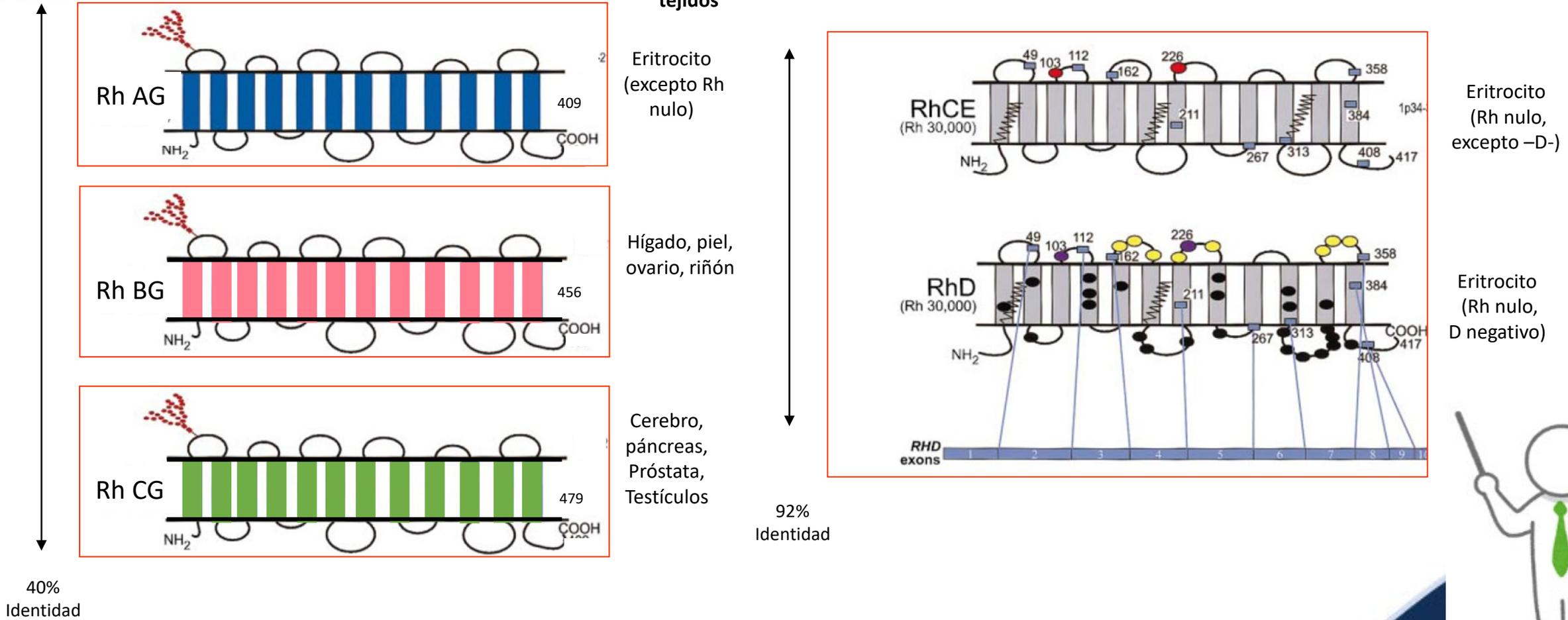
- Simpático
- Sensible
- Amable
- Generoso
- Sincero

libel y su

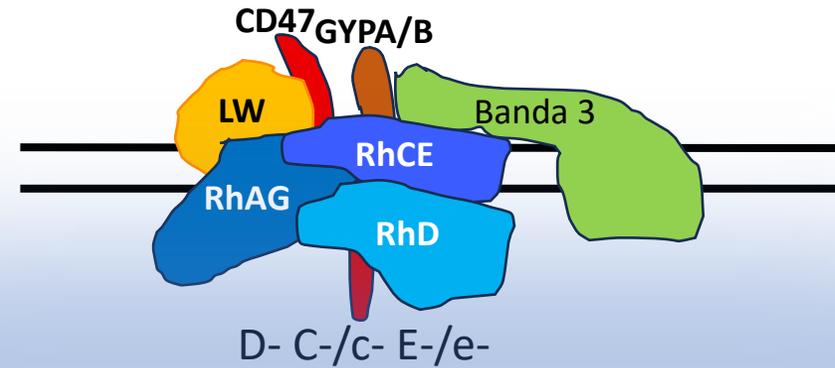
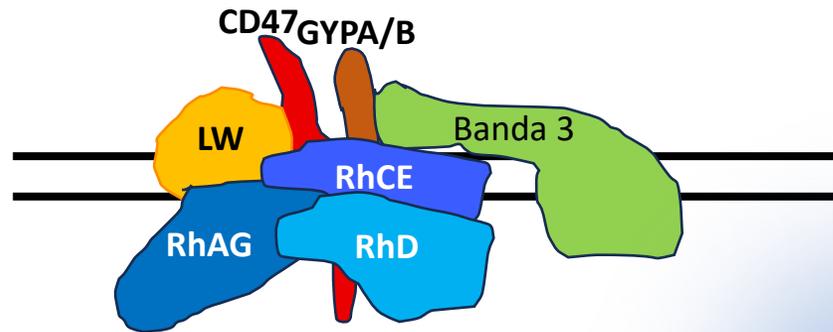


# Fenotipo Sistema Sanguíneo Rh

# Familia de Proteínas Rh humanas



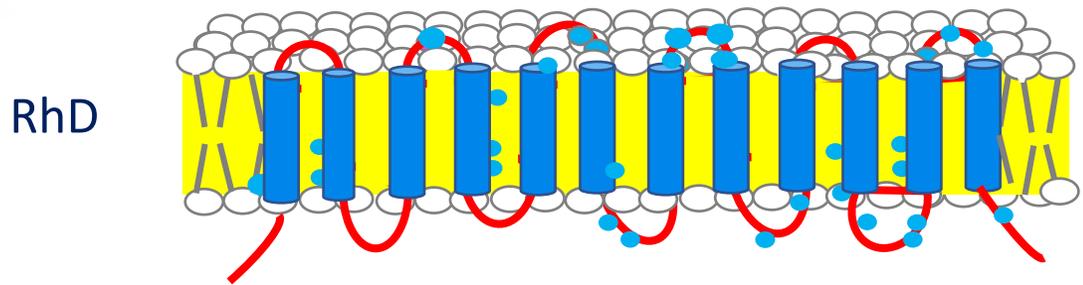
# Proteínas Rh en la Membrana del Glóbulo Rojo



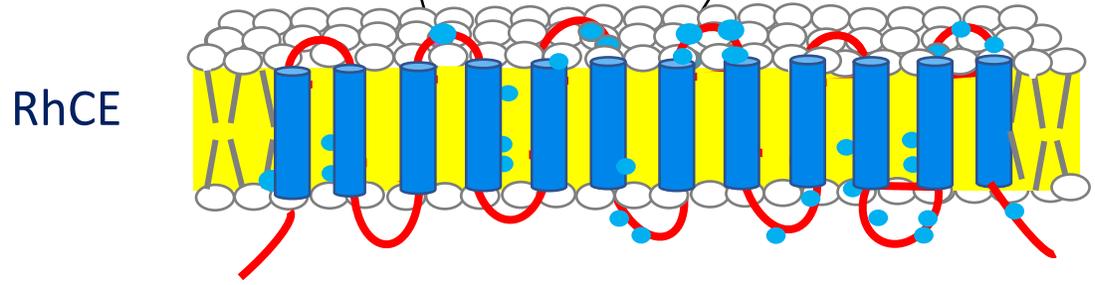
Fenotipo Rh nulo:  
Ausencia de las proteínas RhD y RhCE

# Fenotipos Rh

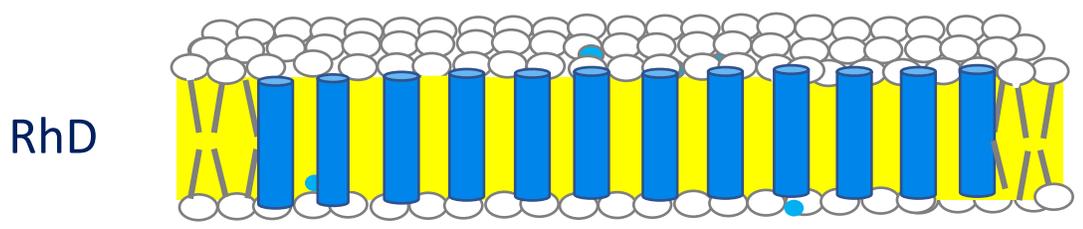
Fenotipo RhD positivo



C/c (Ser 103 Pro) E/e (Pro 226 Ala)

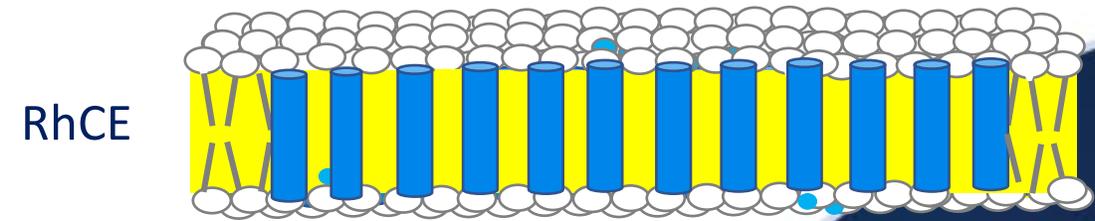
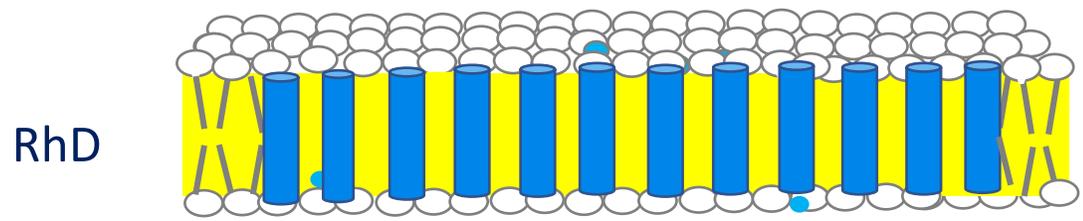


Fenotipo RhD negativo



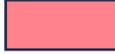
Antígeno	Aminoácido
C+	103 Serina
c+	103 Prolina
E+	226 Prolina
e+	226 Alanina

Fenotipo Rh nulo



# Antígenos que portan las Proteínas RhD y RhCE

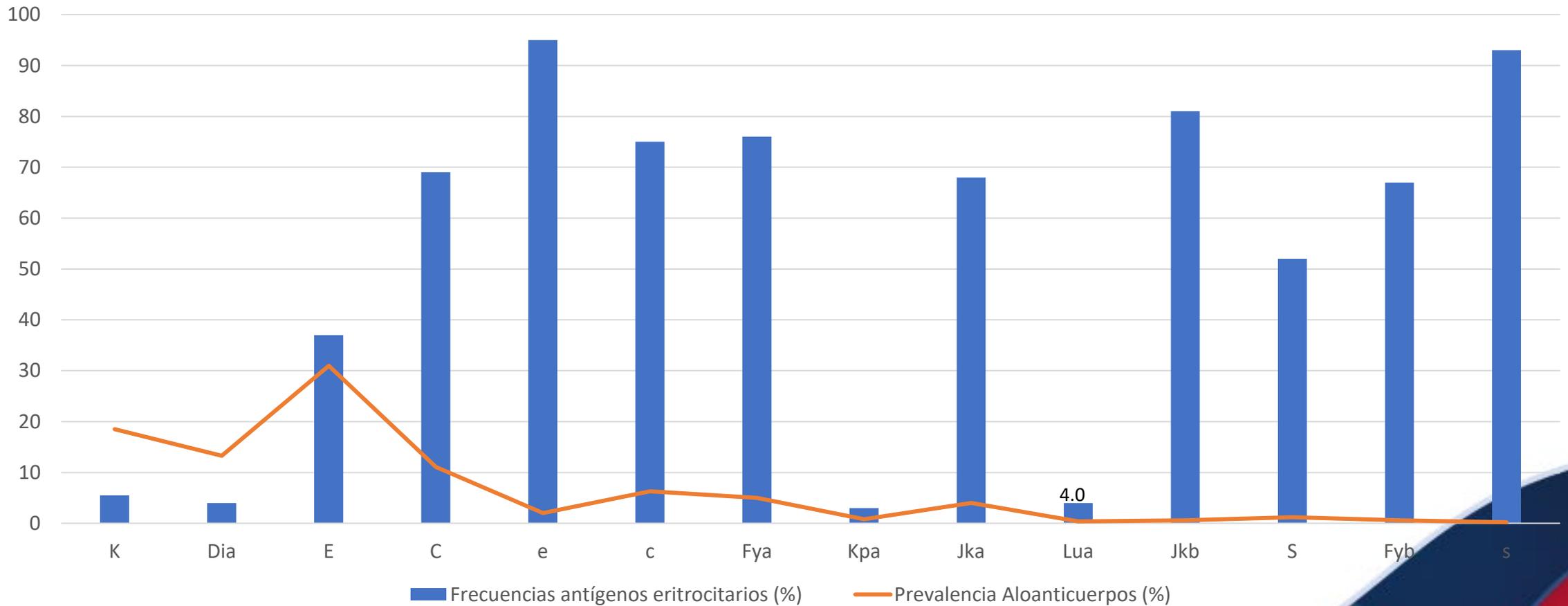
56

- Polimórficos 
- Baja Frecuencia 
- Alta Frecuencia 
- Compuestos 

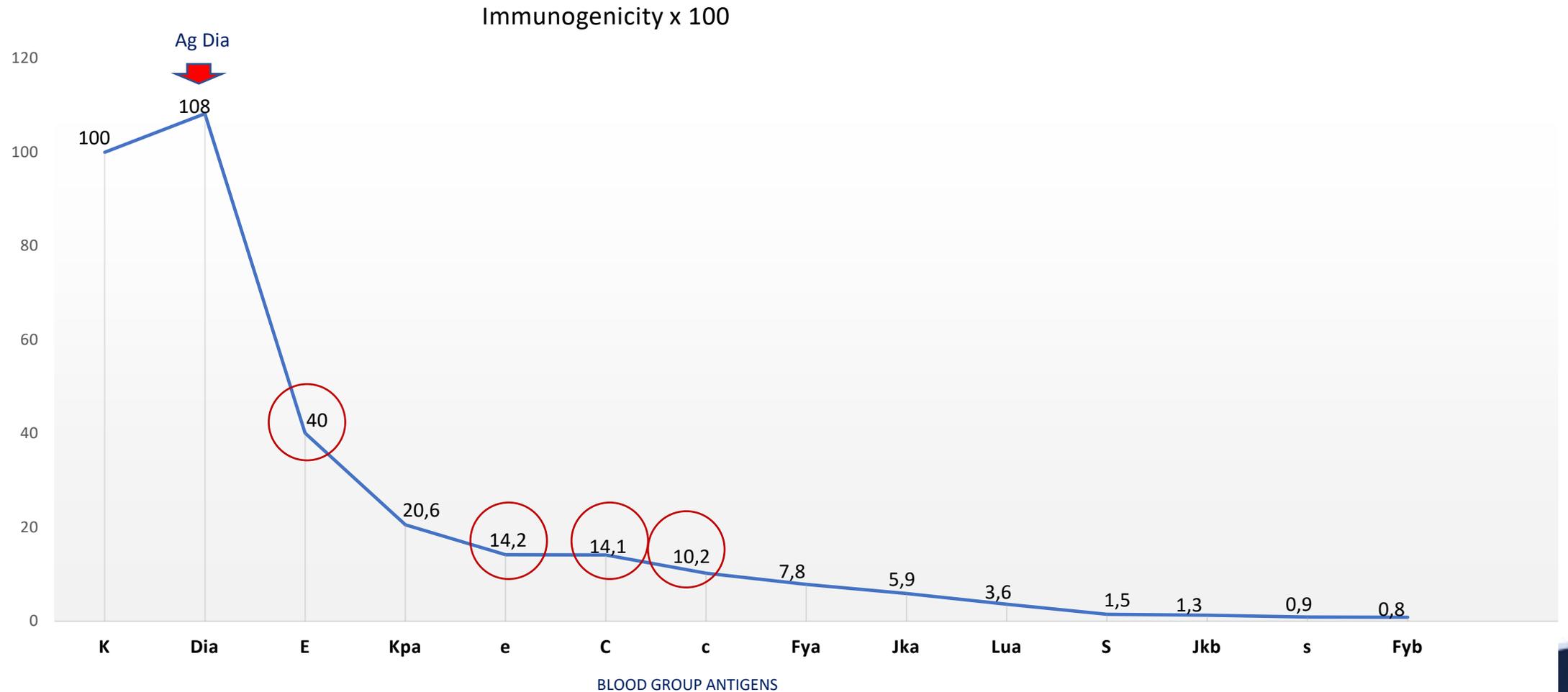
1	2 (4)	3 (5)	4 (2)	5 (3)	6	7	8 (9)	9 (8)	10	11	12
D	C	E	c	e	f	Ce	C <sup>w</sup>	C <sup>x</sup>	V	E <sup>w</sup>	G
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
...	...	...	...	Hr <sub>0</sub>	Hr	hr <sup>s</sup>	VS	C <sup>G</sup>	CE	D <sup>w</sup>	...
25	26 (55)	27	28	29	30	31	32 (46)	33	34	35	36
...	c-like	cE	hr <sup>H</sup>	Rh29	Go <sup>a</sup>	hr <sup>B</sup>	Rh32	Rh33	Hr <sup>B</sup>	Rh35	Be <sup>a</sup>
37	38	39	40	41	42	43 (58)	44	45	46 (32)	47	48 (57)
Evans	...	Rh39	Tar	Rh41	Rh42	Crawford	Nou	Riv	Sec	Dav	JAL
49	50	51	52 (8)	53	54	55 (26)	56	57 (48)	58 (43)	59	60
STEM	FPTT	MAR	BARC	JAHK	DAK	LOCR	CENR	CEST	CELO	CEAG	PARG

# Inmunogenicidad Antígenos Rh

Frecuencias antígenos eritrocitarios donantes de Santiago versus Prevalencia de aloanticuerpos pacientes de Santiago



# Inmunogenicidad Antígenos Rh



Immunogenicity calculation performed with the antigenic frequencies of donors from Santiago and the frequency of antibodies of the same specificity from patients treated at the same institution.

# Variantes de RhD



DE REFERENCIA

Weak D

123



## Interpretación de resultados

El informe de resultados debe establecer claramente si el paciente o donante es “Rh D positivo” o “Rh D negativo”.

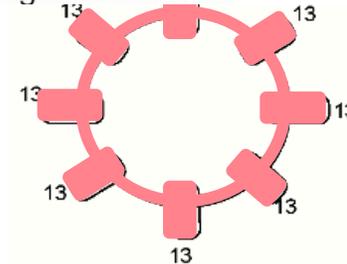
La presencia de variantes del antígeno Rh D debe ser interpretado como “Rh D positivo (Variante)” acompañados de una observación que para efectos transfusionales o embarazo debe ser considerado como “Rh D negativo” hasta que se resuelva su investigación por biología molecular.

DOCUMENTOS TÉCNICOS PARA EL LABORATORIO CLÍNICO

## RECOMENDACIONES PARA LA CLASIFICACIÓN SANGUÍNEA RHD

VERSIÓN 1 | 2018

DEPARTAMENTO LA



# Antigenicidad de RhD

D positivo  
R2R2

D negativo

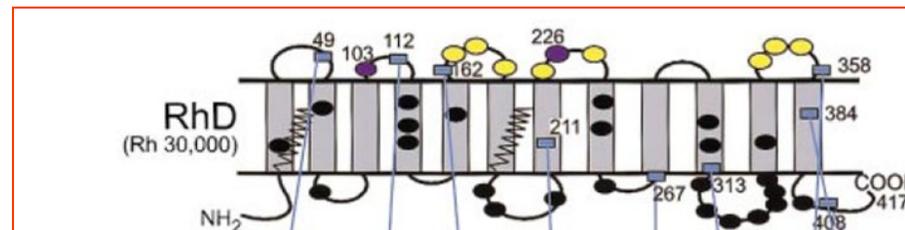


Ausencia de epítopes D

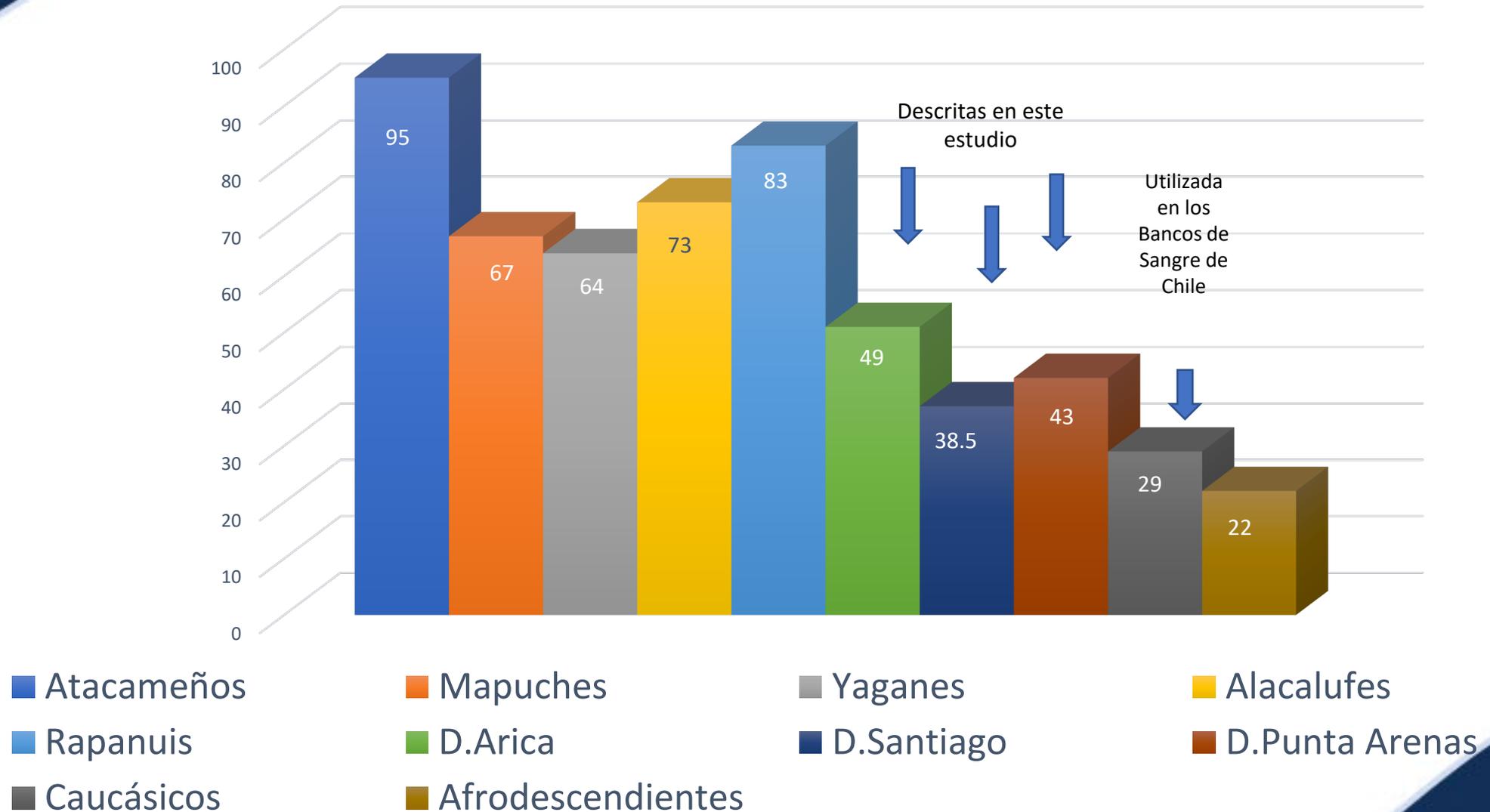
“Mayoría” de epítopes D presentes



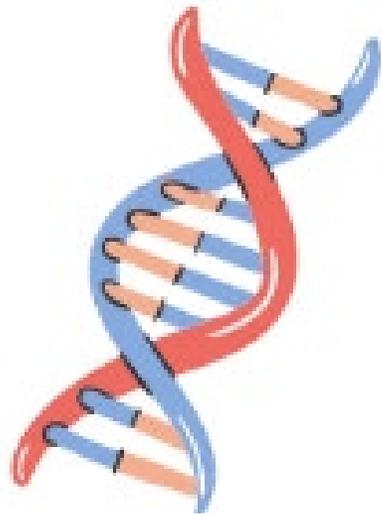
Aumento de la densidad de sitios de antígeno D



# Frecuencias (%) Antígeno E sistema Rh

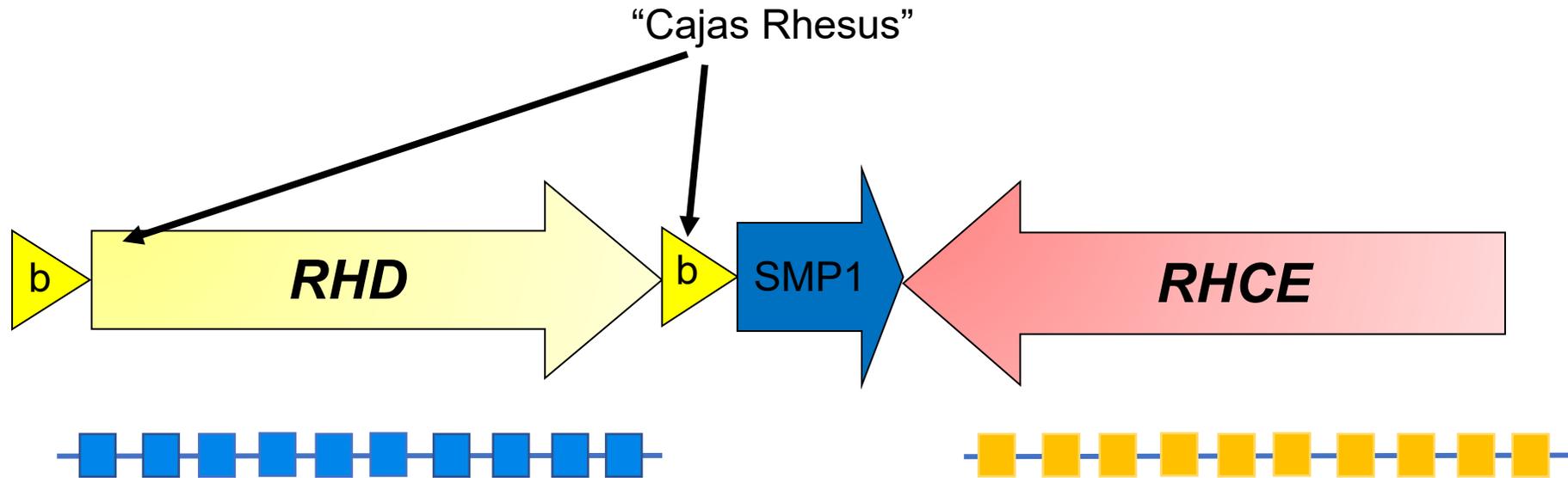


# Genotipo Sistema Sanguíneo Rh



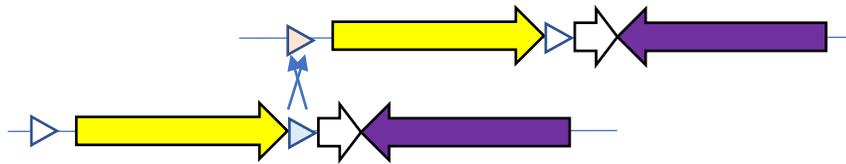
# Genes *RHD* y *RHCE*

---

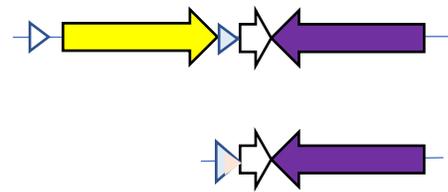


# Mecanismos Moleculares subyacentes a la Expresión del Fenotipo RhD y RhCE

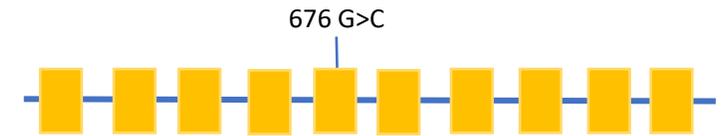
Entrecruzamiento desigual



Delección



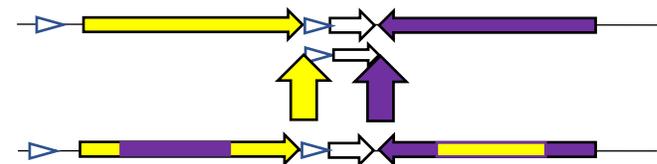
SNPs



Inserción



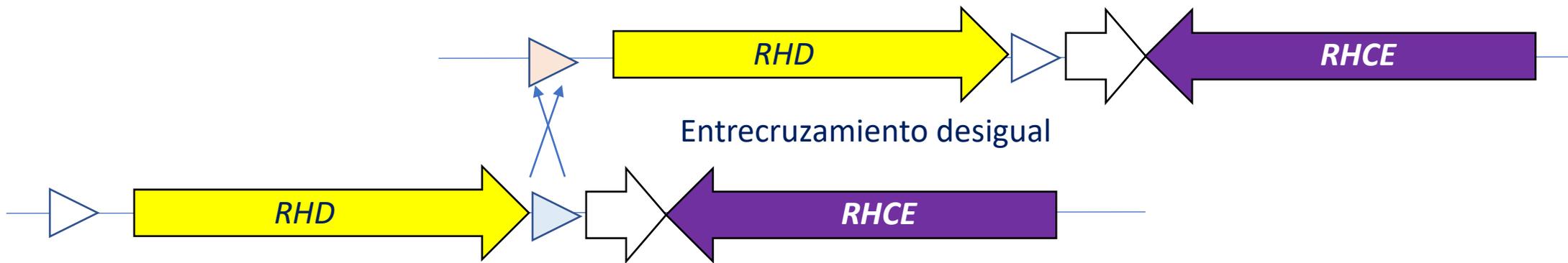
Conversión Génica



# Genes *RHD* y *RHCE*

## Entrecruzamiento desigual y Delección

Entrecruzamiento desigual



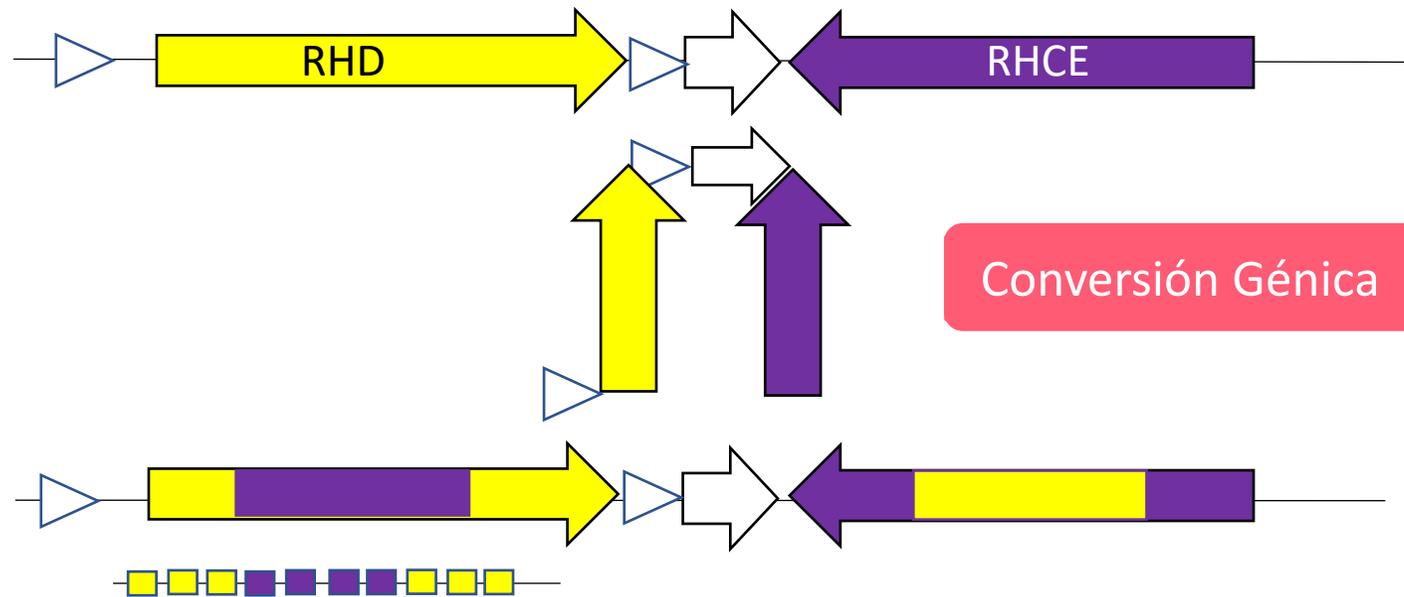
RhD  
Negativo

Delección



# Genes *RHD* y *RHCE*: Conversión génica

- Gen *RHD-CE(4-7)-D*



*RHD-CE(4-7)-D*



Fenotipo Rh D negativo

Genes Híbridos

# Genes Híbridos del Sistema Sanguíneo Rh

**RHD**

**RHCE**



D<sup>VI</sup> Tipo I



D<sup>VI</sup> Tipo II



D<sup>VI</sup> Tipo III



D<sup>IV</sup> b



Evans+

DBT1



Rh32+

d(C)ce<sup>s</sup> tipo I



VS+V-

# Genes Híbridos: Sistema Sanguíneo Rh

*RHD*

*RHCE*



Rhce: ceHAR



$e^{w}$  Rh33+, FPTT+ (ABF)

RhcE: E tipo II (EKK)



$E^{+/-}$  (c)

RhCe: CeCW



$C^{w+}$  MAR- (ABF y ausencia de AAF)

# Enfermedad Hemolítica Fetal y del Recién Nacido por Antígenos producidos por Genes Híbridos

**EHFRN severa o extremadamente severa mortales o con requerimiento de transfusiones se han reportado :**

- anti-RH1 (-D) associated with DVI
- DBT and DIVb phenotypes
- RHD\*12.04 (DOL4)
- RHD\*03.03 (DIIIc)
- RHD\*D-CE(2-5)-D
- RHD\*01EL.31 (RHD\*148+1T)
- anti-RH9 (-C<sup>X</sup>)
- anti-RH11 (-E<sup>W</sup>)
- anti-RH17 (-Hr<sup>0</sup>)
- anti-RH18 (-Hr)
- anti-RH19 (-hr<sup>S</sup>)
- anti-RH23 (-D<sup>W</sup>)
- anti-RH29 ("total" Rh)
- anti-RH30 (-Go<sup>a</sup>)
- anti-RH32
- anti-RH34 (-Hr<sup>B</sup>)
- anti-RH36 (-Be<sup>a</sup>)
- anti-RH40 (-Tar), anti-RH46 (-Sec)
- anti-RH48 (-JAL)
- anti-RH54 (DAK)
- RHCE\*02.08.02 (RHCE\*C<sup>W</sup>-RHD(6-10))
- RHCE\*03N.01 (RHCE\*cEMI).

**EHFRN moderada se ha reportado en:**

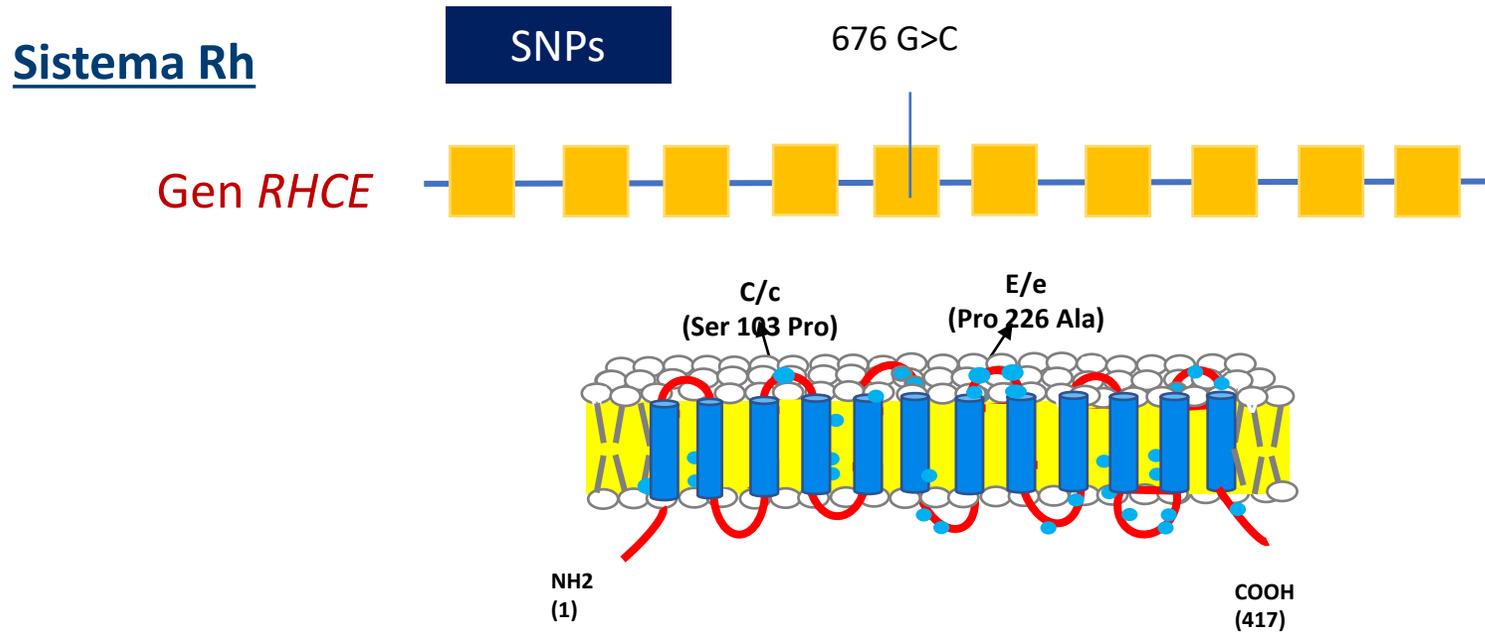
- anti-RH1 associated with DHar
- DIIIa and DIVa phenotypes
- RHD\*01EL.08 (RHD\*486+1A)
- RHD\*01EL.44 (RHD\*D-CE(4-9)-D)
- RHD\*25 (DNB)
- anti-RH20 (-VS)
- anti-RH31 (-hr<sup>B</sup>)
- anti-RH37 (-Evans)
- anti-RH42
- anti-RH49 (-STEM),
- anti-RH51 (-MAR),
- anti-RH55 (-LOCR), anti-RH58 (-CELO).

**Test de antiglobulina humana directa positivo en RN pero sin EHFRN clínicamente significativa**

- anti-RH1 (-D) associated with RHD\*10.05 (DAU5),
- RHD\*12.02 (DOL2).

Debido a la gran cantidad de especificidades que están asociadas a EHFRN en el sistema sanguíneo Rh, todos los anticuerpos Rh debieran ser como potencialmente capaces de causar EHFRN, incluso si aún no ha sido reportado.

# Deducción Fenotipo RhD y RhCE a partir del Genotipo genes *RHD* y *RHCE*



Polimorfismo	.....GCG....	....CCG....
Alelos	<i>RHCE*ee</i>	<i>RHCE*EE</i>
Proteína	Alanina	Prolina
Fenotipo	e+E-	E+e-

# Métodos para estudio del genotipo

- PCR RFLP
- Microarray
- Secuenciación

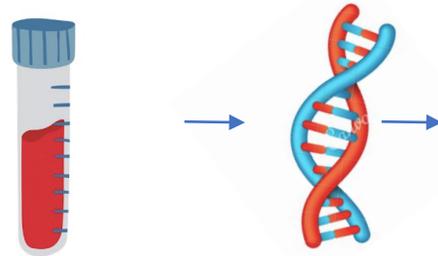
Métodos “in house”, kit o plataformas comerciales



# Amplificación Regiones Genómicas de Interés

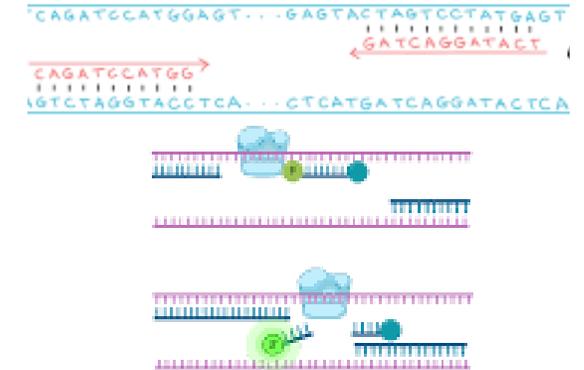
- SSP
- Tiempo real
- Digital
- Múltiplex

## Extracción de DNA

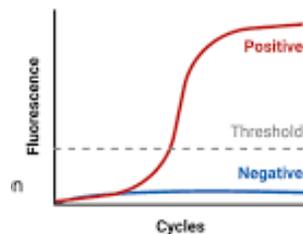
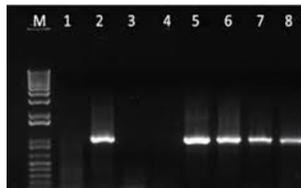


## Preparación de MIX

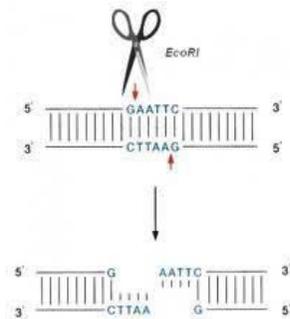
dNTPs, Mg<sup>2+</sup>,  
Partidores, Taq Pol



## Amplificación



## Digestión



## Hibridación



Genotipo

Fenotipo deducido



# PCR en Tiempo Real para estudio del gen *RHD* en ADNfI en plasma de embarazadas RhD negativo

Se administra profilaxis anti-D a todas las embarazadas RhD-, sin saber si el feto es D+ o D-

Las técnicas para obtención de sangre fetal son invasivas, incluso con riesgo de muerte fetal.



Aprox, solo un 40 a 60% de las gestantes Rh(D)- son portadoras de un feto Rh (D)+.

#### Early report

#### Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum

*Y M Dennis Lo, Noemi Corbetta, Paul F Chamberlain, Vik Rai, Ian L Sargent, Christopher W G Redman, James S Wainscoat*

Se puede conocer el fenotipo RhD del feto deducido del estudio del genotipo *RHD* en ADNfI

# PCR en Tiempo Real para estudio del gen *RHD* en ADNfl

Método *in house*, resultados Clínica Santa María



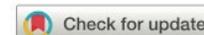
Resultados genotipo <i>RHD</i> en ADNfl y fenotipo RN en sangre de cordón			
	Resultado	n	(%)
Gen <i>RHD</i> en ADNfl	Positivo	37	72,5
	Negativo	14	27,5
Fenotipo RhD en sangre de cordón	Positivo		
	Negativo		



Resultados genotipo <i>SRY</i> y sexo fetal por ecografía			
	Resultado	n	(%)
Gen <i>SRY</i> en ADNfl	Positivo	29	56,9%
	Negativo	23	43,1%
		29	56,9
		23	43,1



Revista Chilena de  
**Obstetricia y Ginecología**



ARTÍCULO ORIGINAL

Los resultados moleculares confirmaron el sexo por ecografía.

**Genotipificación del gen *RHD* en ADN fetal libre en plasma de embarazadas RhD negativo**

**Genotyping of the *RHD* gene in free fetal DNA in plasma of RhD negative pregnant women**

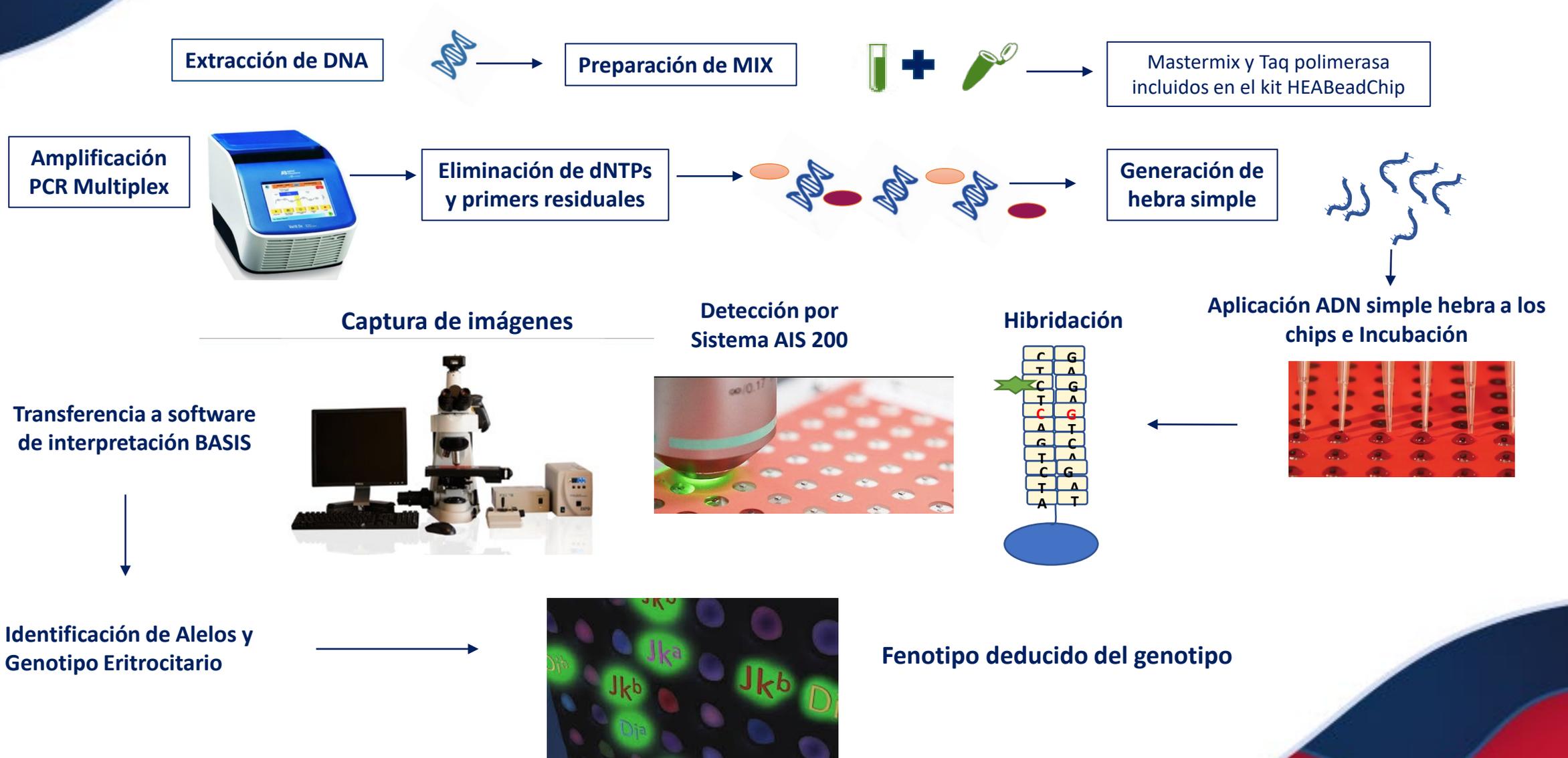
María A. Núñez-Ahumada<sup>1\*</sup>, Fernando Pontigo-González<sup>1</sup>, Sergio Farías-Peñailillo<sup>1</sup>,  
Cristian Villalobos-Pavez<sup>1</sup>, Edgardo Saa-Díaz<sup>1</sup>, Andrea Canals-Cifuentes<sup>2</sup> e Iván Rojas-Tapia<sup>3</sup>

Los resultados moleculares confirmaron el sexo por ecografía, especificidad, y valores

El genotipo *RHD* en ADNfl permite deducir el fenotipo del feto:

- Administrar la IgG anti-D solo a las portadoras de un feto RhD+.
- Sacar del grupo de riesgo a las portadoras de un feto RhD-.
- No arriesgar la seguridad fetal con procedimientos invasivos

# Microarray para Genotipificación y Obtención de Fenotipo Deducido



# Informes

Genotipo

PreciseType Human Erythrocyte Antigen (HEA)  
Genotype by DNA Analysis Report

Sample Information		Blood Group	Polymorphism	Result	Comments
Patient/Donor Name:	_____	Rh	307C>T (RhCE-P103S)	AX	
Patient/Donor ID:	_____		109-bp Ins (RhCE-109Ins)	AB	
Sample ID:	9034287-8		676G>C (RhCE-A226P)	AB	
Chip ID:	HEAH2844_1		1006G>T (RhCE-G336C)	AA	
Status:	Ax(1)		733C>G (RhCE-L245V)	AA	

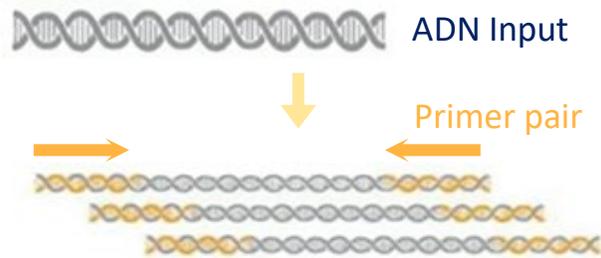
Fenotipo deducido

PreciseType Human Erythrocyte Antigen (HEA)  
Phenotype by DNA Analysis Report

Sample Information		Blood Group	Antigen	Result	Comments
Patient/Donor Name:	_____	Rh	C	+	
Patient/Donor ID:	_____		C	+	
Sample ID:	9034287-8		e	+	
Chip ID:	HEAH2844_1		E	+	
Status:			V	0	
Lot #:	19-80-V		VS	0	
Chip Read Date:	07 Mar 2018 17:11 (AUS Local Time)				

# Secuenciación de Siguiete Generación

## Amplificación



## Amplificación : librería



## Formato Fastq de lecturas secuenciadas

```
@IL31_4368:1:1:996:8507:2  
TCCTTACCCCAAGCTCCATACCTCCTAATGCCACACCTTACCTTAGGA  
+  
FFCEFFFEFFFEFFFEFFFEFFFEFFFCFC<EEFFFFCFE<;EEFF=FEE?FCE  
@IL31_4368:1:1:996:21421/2  
CAAAAACCTTCACTTTACCTGCGGGTTCCCGATTACATTCCACTGTTTGC  
+  
>DBDDDB,B9BAA4AAB7BB?7BBB=91;+*0;5<87+*=/**@?9=73=.7)*  
@IL31_4368:1:1:997:10572/2  
GATCTTCTGTGACTGGAAGAAAATGTTACATATTACATTCTGTCCCATTTG  
+  
E7=EECE<EEEE98EEEEAEED??BE@AEAB><EEABCEDEC<<EBDA-DEE  
@IL31_4368:1:1:997:15684/2  
CAGCCTCAGATTCAGCATTCTCAAATTCAGCTGCGGCTGAAACAGCAGCAGGAC  
+  
EEEEDEE9EAEEDEEEEEEEEEECEAAEEDEE<CD=D*BCAC?;CB,<D@,  
@IL31_4368:1:1:997:15249/2  
AATGTTCTGAAACCTCTGAGAAAGCAAATATTTATTTAATGAAAAATCCTTAT  
+  
EDEEC;EEE;EEE?EECE;7AEEEEE07EECEA;D6D>+EE4E7EEE4;E=EA  
@IL31_4368:1:1:997:6273/2  
ACATTTACCAAGACCAAGGAAACTTACCTTGCAAGAATTAGACAGTTCATTTG  
+  
EEAAFFFEFFFCFAFFAFCCFFFEFF?EFFFFB?ABA@ECE=<F@DE@DDF;  
@IL31_4368:1:1:997:1657/2  
CCCACCTCTCAATGTTTCCATATGGCAGGGACTCAGCACAGGTGGATTAAT  
(...)
```

## Remoción de partidores

Digestión parcial de amplicones



## Cuantificación y Pool



## Unión adaptadores (contienen index)

Adaptador



## Secuenciación



Archivo BAM

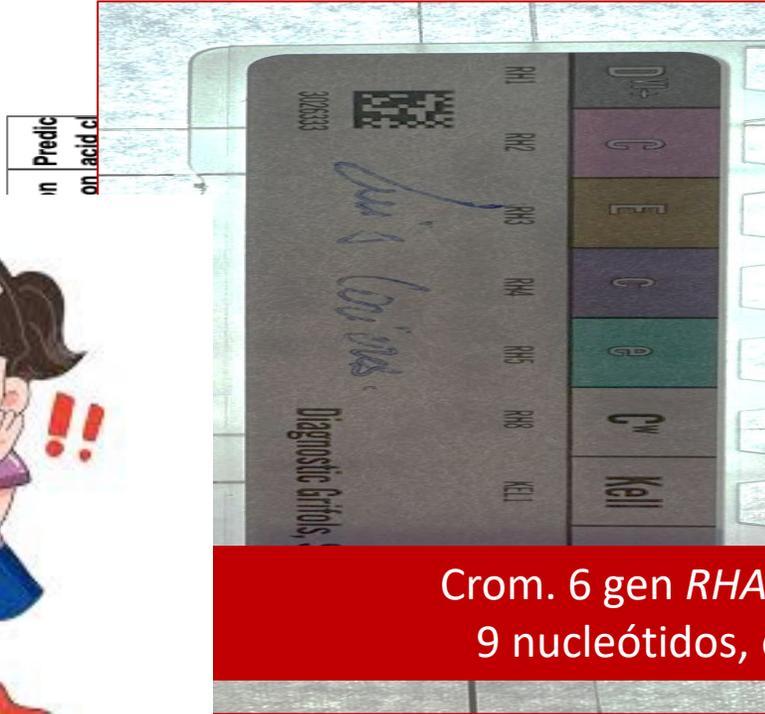
Archivo VCF

# Recién Nacido con fenotipo RhD positivo variante

- Recién nacido, O RhD positivo
- D: aglutinación débil en fase SAGH con anti-D m
- Fenotipo: R1r
- PAD: Negativo
- PCR SSP con kit Baggene: RhD positivo
- Secuenciación (NGS): 676C, 787A y 800T

Phenotype	Allele name
DVI type 1 RH:—52 (BARC—)	<i>RHD</i> *06.01 <i>RHD</i> *DVI.1

# Secuenciación de Siguiete Generación



Crom. 6 gen *RHAG*, VUS: deleción no Frameshift, 9 nucleótidos, exón 2, deleción proteína 3 á



```
+
E7=EECE<EEEE98EEEEAEED?7BE@AEAB><EEABCEDEEC<<EBDA=DEE
@IL31_4368:1:1:997:15684/2
CAGCCTCAGATTCAGATTTCIAAATTCAGCTGCGGCTGAAACAGCAGCAGGAC
+
EEEEDEEE9EAEDEEEEEEEEEECEAAEEDER<CD=D=*BCAC?;CB,<D@,
@IL31_4368:1:1:997:15249/2
AATGTTCTGAAACCTCTGAGAAAGCAAATATTTATTTAATGAAAAATCCTTAT
+
EDEEC;EEE;EEB?EECE;7AEDEEE07EECEA;D6D>+EE4E7EEE4;E=EA
@IL31_4368:1:1:997:6273/2
ACATTACCAAGACCAAGGAAACTTACCTTGCAAGAATTAGACAGTTCAATTG
+
EAAAFFFEFEFCFAFFAFCCFFFEF>EFFFB?ABA@ECEE=<F@DE@DDF;
@IL31_4368:1:1:997:1657/2
CCCACCTCTCAATGTTTCCATATGGCAGGACTCAGCACAGTGGATTAAT
```



# Conclusiones

- El sistema sanguíneo Rh es muy complejo y polimórfico.
- Es importante la actualización constante ya que la generación de información es vertiginosa.
  - Queda mucho por descubrir de este sistema.
- La rigurosidad y observación de los resultados serológicos impactarán en los resultados
- La BM es especialmente relevante en el estudio del sistema Rh.
  - ¿Serología o Biología Molecular?



2he5fs	(10), Abstract	n.a.	n.a.
ier79Asn	PMID: 29508504	GQ477180	rs121918588
3ly182Ser	PMID: 34309028	MN570784	
3ly370Arg	(13), in press	OM793280	rs751577470

Rhnull	RHAG*01N.19	c.543delT
Rhnull	RHAG*01N.20	c.672C>A
Rhnull	RHAG*01N.21	c.571C>T
Rhnull	RHAG*01N.22	c.540C>A
Rhnull	RHAG*01N.23	c.532delG
Rhnull	RHAG*01N.24	c.12delA
Rhnull	RHAG*01N.25	c.238G > A

[mnunez@clnicasantamaria.cl](mailto:mnunez@clnicasantamaria.cl)

[maria.nuneza@mail.udp.cl](mailto:maria.nuneza@mail.udp.cl)