



Primer caso de genotipificación del gen RhD en el Hospital Nacional de Niños Dr Carlos Sáenz Herrera.

Manrique Fonseca Salazar¹

AFILIACIONES: ¹División de Inmunoematología y Banco de Sangre Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera

RESUMEN. RH1 (Antígeno D) es un antígeno clínicamente significativo en terapia transfusional. Sus variantes generan errores en su determinación y provocan aloinmunización del receptor, situación de interés en mujeres en edad fértil con potencial de gestación debido a las implicaciones en la anemia hemolítica del feto y recién nacido (AHFRN). Su caracterización es esencial para garantizar la seguridad del receptor, ya que sobre estos resultados y su incertidumbre se toman decisiones de hemoclasificación, uso de esquemas transfusionales y aplicación de terapias como profilaxis Rh. (Fung et al., 2020; Silvy et al., 2012).

La genotipificación del gen RHD aplicada al fenotipaje de pacientes, donadores, mujeres embarazadas y post parto puede proveer información que mejore la práctica transfusional y las políticas de administración de otras terapias en portadores (Sandler et al., 2014; Stanic et al., 2020). Se presenta un caso clínico cuya determinación del antígeno D mediante genotipificación del gen RhD puede cambiar el curso de intervenciones posteriores en estas situaciones mencionadas.

PALABRAS CLAVE. Antígeno D, genotipaje, aloinmunización, alelos, variantes, fenotipo

ABSTRACT. RH1 (Antigen D) is a clinically significant antigen in transfusion therapy. Its variants generate errors in its determination and cause alloimmunization of the recipient, a situation of interest in women of childbearing age with childbearing potential due to the implications for hemolytic anemia in the fetus and newborn. Its characterization is essential to guarantee the safety of the recipient, since these results and their uncertainty are used to inform decisions regarding hemoclassification, use of transfusion regimens, and application of therapies such as Rh prophylaxis. (Fung et al., 2020; Silvy et al., 2012). Genotyping of the RHD gene applied to the phenotyping of patients, donors, pregnant and postpartum women can provide information that improves transfusion practice and policies for the administration of other therapies in carriers (Sandler et al., 2014; Stanic et al., 2020). A clinical case is presented whose determination of the D antigen through genotyping of the RhD gene can change the course of subsequent interventions in these aforementioned situations.

Dirección para correspondencia,
dirigida a:

Manrique Fonseca Salazar
mfonsecas74@gmail.com

Recibido: 26 de noviembre 2024

Aceptado: 22 de abril 2025

Publicado: 30 de abril 2025

KEYWORDS. Antigen D, genotyping, alloimmunization, alleles, variants, phenotype Descripción del caso

INTRODUCCIÓN. Los antígenos y fenotipos RH pueden caracterizarse utilizando serología, genotipificación, citometría de flujo, incluso el modelado tridimensional de la proteína (Fung et al. 2020; Hult, 2018). Estos métodos de detección han estado orientados a disminuir la incidencia de formación de alo anticuerpos anti-D en eventos sensibilizantes como transfusiones o embarazo. Las técnicas serológicas sugieren la existencia de variantes en el antígeno D, pero son incapaces de determinar su asociación con la formación de anti-D. La genotipificación disponible no identifica todos los genotipos RHD capaces de formar anti-D, pero sí identifican el 95% de los que no tienen ese riesgo y pueden clasificarse con seguridad como Rh positivos. La sinergia presentada entre la genotipificación de grupos sanguíneos y las demás técnicas indica que no todas las variantes del antígeno D deben ser tomadas como iguales a nivel de receptor.

MATERIALES Y METODOS

Descripción del caso. Paciente femenina de 17 años, con diagnóstico de bajo peso e hipercolesterolemia, sin transfusiones previas, que se presenta al hospital para una cirugía electiva. Se le solicita reservas de hemocomponentes para lo cual se obtiene una muestra con EDTA y se envía al Banco de Sangre para realizar pruebas pre transfusionales.

Equipo y reactivos utilizados. Según los lineamientos de la Caja Costarricense de Seguro Social la determinación de antígeno D en pacientes se realiza inicialmente mediante aglutinación en columna en Cassette ABO-Rh / Inverso Quidel Ortho (DVI-), bufferizada. El material (pelotas de vidrio) que compone la columna sirve como filtro que detiene los glóbulos rojos aglutinados durante la centrifugación de este. Los ensayos se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se tiene una reacción positiva cuando un antígeno eritrocitario reacciona con el correspondiente anticuerpo, (inmerso en la columna o presente en la muestra) observándose aglutinación en la parte superior o a lo largo de la columna (Collodel & Gessoni, 2024).

RESULTADOS. Al obtenerse un resultado $\leq 2+$ en el pocillo con anti-D (Tabla 1) y tomando en cuenta las características de la paciente se procede a su detección cualitativa "in vitro" mediante la prueba de antiglobulina indirecta en Cassette AGH Anti-IgG con Ortho Sera Anti-D (IAT) (confirmación del antígeno D), cuyo resultado es una aglutinación de 2+. Se procesó la muestra también con el cassette ABD/ABD que utiliza una clona distinta, obteniéndose un resultado similar. Frente a tales resultados la muestra se envía a genotipaje al Versiti Blood Research Institute en Wisconsin, Estados Unidos de América.

Tabla 1. Transcripción de resultados en aglutinación en columna Cassette ABO-Rh / Inverso Quidel Ortho (DVI).

Anti-A	Anti-B	Anti-D	Control	Células A	Células B	Rastreo (R.A.I)
0	0	2+	0	4+	4+	Negativo

En el Centro de Referencia la muestra se enfrentó a cuatro antisueros distintos (Biotest Seraclone, Immucor GammaClone, Immucor Series 5, y Ortho Bioclone) aprobados por la Food and Drug Administration, (FDA). En estos ensayos se presentó reactividad variable luego de centrifugación inmediata en tubo con metodología validada y realizada en conformidad con los protocolos y recomendaciones del fabricante.

La reactividad variable y débil con estos reactivos levanta la sospecha de una variante D. En este punto la muestra se procesa utilizando un kit de detección de fluorescencia de punto final en reacción en cadena de la polimerasa con cebador específico único (Single Specific Primer-Polymerase Chain Reaction SSP-PCR), que permite la amplificación de una secuencia genómica parcial mediante el desplazamiento unidireccional partiendo de regiones conocidas a regiones desconocidas del cromosoma.

Las especificaciones del fabricante hacen claro énfasis en que el kit únicamente detecta los alelos D variantes más frecuentes en la población (tipo 1,2,3,4,4.0,4.1,4.2 (DAR),5,11,14,15,17), así como los alelos DEL más comúnmente encontrados a nivel mundial, DEL (M295I),DEL (K409K),DEL (IVS3+1G>A). El ensayo identifica una variante D débil tipo 1.

El reporte del centro de referencia indica que portadores del fenotipo débil Tipo 1 pueden considerarse como D positivo, administrando unidades D positivo y con la recomendación de no necesitar profilaxis D. Al momento de la publicación de este caso, la paciente no ha requerido transfusión de glóbulos rojos empacados, sin embargo, será considerada como RhD positivo tanto a nivel transfusional como en profilaxis, según recomendación.

Debido a este contexto surge algunas interrogantes. Primero, la posibilidad de tratarla como RhD negativo tal y como está establecido. Segundo, el hecho de que todas las variantes del antígeno D deban identificarse y tratarse por igual a nivel transfusional.

Caso clínico

Los cambios de aminoácidos en fenotipos D parciales se localizan en los bucles extracelulares. Se muestra la mutación DNB (G355S) círculo naranja, frecuentemente encontrada en Europa. En cuanto al fenotipo Del la línea irregular celeste muestra la pérdida de la región 3', encontrada mutaciones asiáticas, y la mutación M295I hallada en población europea, se muestra en el noveno bloque transmembrana representada como un círculo rojo (Fung et al. 2020; Sandler et al., 2017).

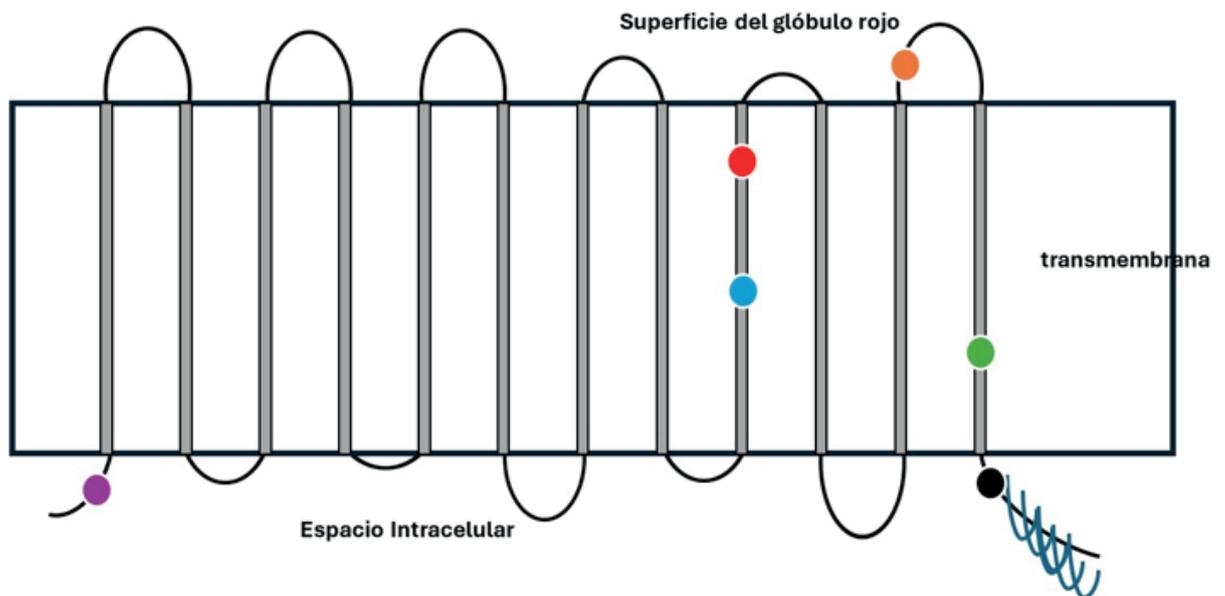


Figura 1. Representación de la ubicación de los cambios de aminoácidos en las proteínas RhD en la membrana eritrocitaria. Adaptado de Sandler et al., (2017), Serological weak D phenotypes: a review and guidance for interpreting the RhD blood type using the RHD genotype.

Al determinar el antígeno D, su cigosidad no puede dilucidarse serológicamente, porque no se observa diferencia mediante aglutinación, además su expresión se ve afectada por la presencia del antígeno C (efecto Cepellini) donde fenotipos R1r' poseen menos antígeno D que las células R2 r". El genotipaje de RhD determina las características moleculares de los alelos RHD responsables de las variantes con el objetivo de implementar estrategias transfusionales aplicables individualmente a receptores y portadores (Collodel & Gessoni, Floch et al., 2024; Toly-Ndour et al., 2020). Metodologías como la citometría de flujo permiten cuantificar sitios antigénicos. En Austria se utilizó para revelar que variantes como el RHD (G336R) y el RHD(F410V) expresan menos de 50 antígenos por membrana (Hutchison et al., 2023).

Relevancia en la diferenciación entre donadores y receptores

En 1946 se descubre el primer fenotipo D débil (Du), y en 1958 los AABB Standards requerían una confirmación para D débil en donadores clasificados primeramente como D negativo mediante aglutinación directa con reactivo anti-D; no así, cuando de receptores se trataba (Fung et al. 2020).

Caso clínico

En 1981 el American College of Obstetricians and Gynecologists recomendaba que: "cuando una mujer RhD negativo, Du positivo o Du negativo y que no ha sido inmunizada contra el antígeno D, da a luz un producto RhD o Du positivo, esta debe ser candidata para inmunoglobulina anti-D". Con la primer directriz se intentaba proteger a receptores D negativo de la exposición a donadores D variantes que resulten en alo inmunización contra ese antígeno, en tanto la segunda protegía a receptores D variantes de unidades provenientes de donadores D positivos, por la misma razón (Sandler et al., 2014, 2017).

Se alentaba clasificar a mujeres en edad fértil y pacientes con fenotipo D variantes como Rh negativo para aminorar la potencial exposición a células D positivas, y haciéndolas candidatas para inmunoprofilaxis para disminuir la incidencia y complicaciones de la AHFRN dada por aloanticuerpos con especificidad anti D. Se implementó entonces este tamizaje en gestantes, mujeres en edad fértil y neonatos D negativos hijos de madres D negativas que no han recibido esta profilaxis; consecuentemente aumentó el consumo de unidades RhD negativo en conformidad con la normativa de transfundirlas a personas con fenotipos que incluyen alguna variante D (Christiansen et al., 2008; Kahwash et al., 2004; Prasad et al., 2006; Sandler et al., 2012, 2014).

En 1999 el College of American Pathologists (CAP) evaluó políticas y prácticas para tamizaje de D variante y administración de inmunoglobulina Rh; y encontraron variabilidad significativa entre los encuestados que causaban un incremento de reportes de casos de personas D positivas con formación de alo anti-D (Sandler et al., 2014).

APLICACIONES DE LA GENOTIPIFICACIÓN DEL GEN RhD EN INMUNOHEMATOLOGÍA Y BANCO DE SANGRE

Genotipificación y esquemas transfusionales

El potencial de inmunización resulta de la extranjería del antígeno (diferencia entre la composición antigénica foránea vs propia); como sucede en la exposición al antígeno D completo o variante en receptores D negativos; y en la exposición a epítomos del antígeno D completo en receptores portadores de variantes carentes de estos. Se empezó a identificar genotipos RHD específicos que formaron o no anti-D post exposición al antígeno convencional. Mediante modelos tridimensionales encontraron que la posibilidad de inmunización dependía de la localización extracelular de las sustituciones de aminoácidos en la membrana eritrocitaria. (Floch et al., 2021; Fung et al. 2020).

Mutaciones que afectan los residuos del bucle extracelular están asociadas a la formación de alo anti-D en portadores expuestos al antígeno D convencional. En tanto que mutaciones que afectan los dominios transmembrana o intracelulares, no tienen impacto importante en aloinmunización (Floch et al., 2021; Raud et al., 2017, 2019; Srivastava et al., 2016).

Caso clínico

Los portadores sensibilizados poseen mutaciones en un bucle exterior del antígeno, tales como el D parcial DVI, los D débiles 4.2 (DAR), 7, 11, 15, y 21. Evidencia sugiere que los D débiles tipo 1,2,3, 4.0/4 y 4.1 pueden ser considerados de manera segura como RhD positivos al poseer una cantidad adecuada de antígenos D intactos y mutaciones en los dominios transmembrana o intracelulares (Fung et al. 2020; Jeong et al., 2021; Sandler et al., 2015 ;Sandler & Queenan, 2017).

Genotipificación y esquemas de profilaxis con inmunoglobulina anti D.

La prevalencia portadores de un D débil varía entre el 0,2% y el 1%, donde un 95% posee un alelo RHD no asociado con la formación de alo anti-D. Esto implica que el 95% de las mujeres portadoras de un fenotipo D débil no corren riesgo de desarrollar anti-D. Sin embargo, según el CAP estas mujeres continúan siendo tratadas como Rh negativas a nivel gestacional y transfusional. Como resultado, reciben una inyección prenatal rutinaria de inmunoglobulina Rh en caso de embarazo (26 y 28 semanas de gestación) y una segunda dosis al nacimiento de un producto RhD positivo, además de transfusiones de glóbulos rojos D negativos. Profilaxis aplicable a todas las mujeres con resultado serológico D negativo, independientemente del RhD del feto (Flegel, 2011; F. F. Wagner et al., 2000; Jeong et al., 2021; Sandler et al., 2015, 2017; Sandler & Queenan, 2017).

Actualmente el ADN fetal libre de células (cffDNA) circulante en plasma de gestantes trajo consigo el diagnóstico prenatal no invasivo de RhD fetal; al punto de poner fin a la tipificación RhD en sangre de cordón y con el beneficio de administrar profilaxis postnatal según el resultado del genotipado del RHD fetal (Núñez-Ahumada et al., 2023; Sørensen et al., 2018; Stensrud et al., 2023).

La sinergia entre ambos métodos se estudió en Chile y en Chipre comparando la genotipificación del gen RHD en plasma materno con la determinación en cordón (utilizando como control el gen SRY). Hallaron alta exactitud en la predicción al comparar resultados (ADN/cordón), también permitió realizar estudios de cigosidad para el antígeno D, y mejorar el manejo de gestantes D negativas (Papasavva et al., 2016; Picchiassi et al., 2015).

DISCUSIÓN. La reactividad serológica conocida en nuestro medio es inconsistente entre las variantes RhD. Variantes con densidad antigénica muy baja o normal pueden no detectarse en donadores mediante criterio de aglutinación directa débil e identificarse solo después de generar un alo anti-D en receptores (Jeong et al., 2021; Sandler et al., 2014; Silvy et al., 2012).

Caso clínico

A nivel transfusional cerca del 95% de los portadores D débil no requieren glóbulos rojos Rh negativos al ser transfundidos. En tanto la característica de carecer de algunos epítomos por parte de los D parciales los hace propensos al desarrollo de un alo-anti D post exposición (Flegel, 2011; F. F. Wagner et al., 2000; Jeong et al., 2021; Polin et al., 2024; Sandler et al., 2014, 2015, 2017; Sandler & Queenan, 2017).

En portadores D débiles 1, 2, 3 y 4.0/4.1 no se han notificado casos de aloinmunización anti-D, y se consideran como D positivos, permitiendo recibir una transfusión segura de glóbulos rojos D positivos. Las gestantes con estas variantes no necesitan recibir inmunoprofilaxis anti-D. Sin embargo, los tipos D débiles 4.2, 11 y 15 si producen alo anti-D luego de exposición a glóbulos rojos D positivo (Flegel, 2006; Flegel et al., 2020; Jeong et al., 2021; Pham et al., 2011; Sandler et al., 2015, 2017; Toly-Ndour et al., 2020; Yin and Flegel 2021).

Un ensayo realizado en Argentina con 18379 pacientes concluyó que la transfusión de glóbulos rojos D positivos a portadores del fenotipo D débiles tipo 1, 2 y 3 podría mejorar el manejo y ahorro de unidades D negativas (Brajovich et al., 2012). Flegel et al (2020) publicó resultados semejantes donde el genotipado cambió la política transfusional con respecto al RhD en 60 pacientes resultando en la conservación de 43% de unidades RhD negativas, así como en la administración de RhIG.

Con respecto a la inmunoprofilaxis, aplicar el genotipado a gestantes generará criterios actualizados para la administración de la misma y el uso de unidades de glóbulos D negativos, disminuyendo tanto la exposición antigénica como el uso del material profiláctico. El beneficio obtenido compensará el costo de realizar esta prueba molecular una vez en la vida (Flegel, 2006; Izard et al., 2024; Kumpel, 2006; Núñez-Ahumada et al., 2023; Sørensen et al., 2018).

Un estudio noruego de comparación del genotipado RHD fetal con el tipaje RhD de recién nacidos en muestras de cordón, permitió suspender la tipificación rutinaria de RhD en cordón umbilical en todo el país y empezar a administrar esta profilaxis en función del resultado del genotipado RHD fetal (Stensrud et al., 2023).

La genotipificación también permite resolver discrepancias en las determinaciones, así estudios realizados en Berna y Zúrich con 26243 donantes fenotipados como RhD negativos, identificaron 65 portadores de alelos RHD. Treinta y uno de ellos fueron redefinidos como RhD positivos (Gowland et al., 2014).

A nivel de estudios de campo y poblacionales, un estudio realizado en Brasil para establecer recomendaciones de políticas de transfusión, reveló que la frecuencia de D parcial supera a los D débiles en pacientes tipificados serológicamente como D débil, y que el alo-anti-D se encontraba en un 16.4% de los casos con resultado de D parcial (Miranda et al., 2021).

Caso clínico

En donadores de sangre chinos se utilizó amplificación de sonda dependiente de ligación múltiple (RH-MLPA) junto al panel D-Screen para determinar el genotipo y la cigosidad en la población, encontrando que RHD*06.03, es la variante más común en el Sur de China seguida del alelo RHD*01W.150 (Ji et al., 2017; Thongbut et al., 2020).

En la región de Han en China se llevó a cabo un ensayo con 317 donadores donde encontraron 11 variaciones de un solo nucleótido en el exón 1 del gen RHCE, que no afectaban significativamente la expresión del gen (Shao et al., 2023).

Recomendaciones

Tanto el Tropical Medicine Research Center (TMRC) Network, como el AABB-CAP Working Group recomiendan la migración de la práctica serológica al genotipado RHD en pacientes con fenotipo D serológico débil, debido a que los portadores de cualquiera de los tres alelos más prevalentes en caucásicos (RHD*01W.1, RHD*01W.2 y RHD*01W.3) pueden gestionarse de forma segura como D positivo. Recientemente se añadió pacientes RHD*09.03.01 (D débil tipo 4.0) y RHD*09.04 (D débil tipo 4.1) a esta lista (Fichou et al., 2016; Sandler et al.,2014, 2015; Stensrud et al., 2023).

Frente a la posibilidad de aloinmunización anti-D se propone realizar genotipificación para RHD en los siguientes casos: (Collodel & Gessoni, 2024; Fung et al. 2020; Sandler et al., 2015).

- Reacción serológica con anti-D directa débil (nula o débil $\leq 2+$) en la prueba inicial, que aumenta moderada o fuertemente en fase de antiglobulina.
- Muestras D negativas con resultado positivo en prueba de antiglobulina directa (PAD).
- Muestras con reactividad discordante en microtubo anti-DVI- / anti-DVI+
- Discrepancias históricas entre métodos y reactivos
- Personas con resultado D positivo, pero formación de anti-D

Ante una discrepancia Rh(D), se recomienda una serie de pasos iniciando con el conocimiento de a quien se le está realizando la determinación : (Clapsos, R.,2017).

- a) Donadores
- b) Posibles receptores
- c) Mujeres embarazadas sin profilaxis
- d) Neonatos nacidos de estas mujeres

Proceder entonces de la siguiente forma:

- Repetir la tipificación con los reactivos originales.
- Tomar en cuenta efecto Cepellini (Fichou et al., 2016; Izard et al., 2024).
- Si se confirman los resultados, realizar pruebas con otros reactivos.

Caso clínico

- Evaluar características de reactivos y métodos utilizados, líneas celulares, reactividad con variantes.
- Determinar si existe información en el instructivo del reactivo explicando la discrepancia.
- Siempre verificar que en la literatura se hayan reportado casos similares.
- Consultar al fabricante.
- Referir a genotipificación (Clapsos, R.,2017).

En la figura 2 se propone que, si se obtiene un primer resultado “RhD negativo”, el portador debe ser tratado como RhD negativo; caso contrario al obtener un resultado “RhD positivo”, el portador debe tratarse como RhD positivo. En tanto con un resultado “fenotipo D serológico variante”, se reprocesa la muestra o se remite para genotipificación RHD a un laboratorio de referencia (Clapsos, R.,2017; Sandler et al., 2014, 2017).

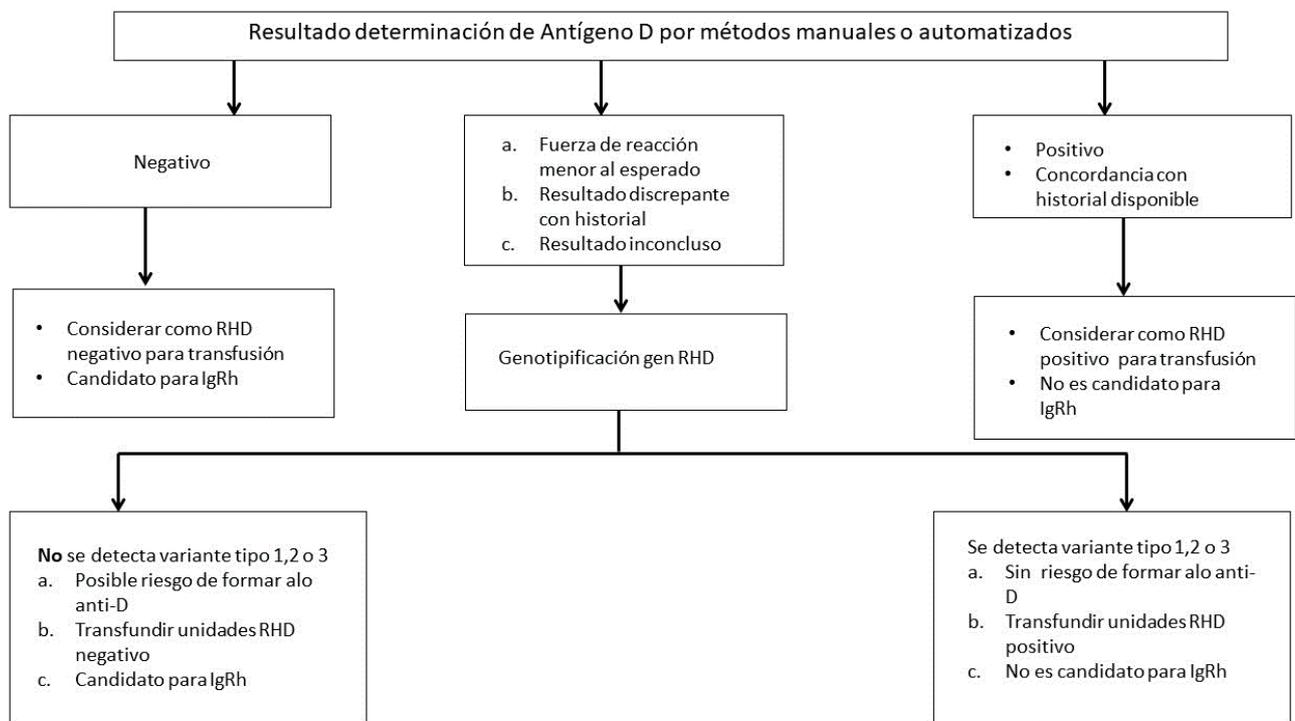


Figura 2. Diagrama de flujo propuesto en caso de obtener un “fenotipo D serológico débil. Adaptado de Sandler et al., (2015). It’s time to phase in RHD genotyping for patients with a serologic weak D phenotype. *Transfusion*, 55, 680–689

Varios autores mencionan la realización de una prueba de antiglobulina humana directa, cuando la confirmación del antígeno D en fase de antiglobulina resulta positiva. AABB y varios autores avalan su implementación como control de interferencia estérica en muestras negativas y para excluir interferencias y autoanticuerpos en muestras positivas. Sin embargo, esta prueba no sustituye el control de aglutinación. Esta práctica se menciona en el estudio The “Serenissima” Experience, donde se realizó para evaluar presencia de autoanticuerpos interferentes.

Debido a que la distribución ciertos genotipos RHD varía según etnicidad y región geográfica, las migraciones hacen que el fenotipo DEL sea de interés mundial debido a informes de aloinmunización al transfundir glóbulos rojos DEL como Rh negativos o en embarazo. (Flegel, 2011; Orzińska et al., 2013; Sandler et al., 2014; T. Wagner et al., 2005; Yasuda et al., 2005).

La determinación serológica continuará siendo el estándar de oro debido a su bajo costo y rapidez de resolución: sin embargo la adición del genotipado RHD actuaría sinérgicamente con la serología con el objetivo de disminuir la administración de profilaxis anti-D y mejorar la transfusión de glóbulos rojos Rh negativos en fenotipo D serológicos débiles, que no deban ser considerados como tales, generando mejoras en los esquemas transfusionales, administración de profilaxis e inventario de unidades D negativo (Gowland et al., 2014; Polin et al., 2024).

En nuestro medio y debido a las limitaciones serológicas actuales este caso, se reportaría como D negativo en tanto se comporte como paciente. Este caso presenta una excepción debida ya que la paciente se tratará como D positivo, administrando unidades D positivo y con la recomendación de no necesitar profilaxis D en algún momento de su vida. Al momento de coleccionar suficiente data, estudios controlados de aloinmunización y costos podrían realizarse, ilustrando el panorama y dilucidando el ahorro en unidades D negativo y en profilaxis anti D.

BIBLIOGRAFÍA

Brajovich, M. E. L., Boggione, C. T., Biondi, C. S., Racca, A. L., Tarragó, M., Nogués, N., Muñoz-Díaz, E., & Cotorruelo, C. M. (2012). Comprehensive analysis of RHD alleles in Argentinians with variant D phenotypes: RHD ALLELES IN ARGENTINEANS. *Transfusion*, 52(2), 389–396.

<https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03297.x>

Christiansen, M., Samuelsen, B., Christiansen, L., Morbjerg, T., Bredahl, C., & Grunnet, N. (2008). Correlation between serology and genetics of weak D types in Denmark. *Transfusion*, 48(1), 187–193. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2007.01504.x>

Collodel, L., & Gessoni, G. (2024). RHD Genotyping to Resolve Weak and Discrepant RHD Phenotypes: The “Serenissima” Experience. *International Blood Research & Reviews*, 15(2), 30–38. <https://doi.org/10.9734/ibr/2024/v15i2337>

Collodel, L., & Gessoni, G. (2024). RHD Genotyping to Resolve Weak and Discrepant RHD Phenotypes: The “Serenissima” Experience. *International Blood Research & Reviews*, 15(2), 30–38. <https://doi.org/10.9734/ibr/2024/v15i2337>

Clapsos, Rosana. (2017). Estudio del antígeno D por métodos serológicos y moleculares Tipificación de donantes, pacientes y gestantes. VI Jornadas de Medicina Transfusional. Instituto de Hemoterapia La Plata- Argentina, 2017

Fichou, Y., Gehannin, P., Corre, M., Guern, A. L., Maréchal, C. L., Gac, G. L., & Férec, C. (2015). Extensive functional analyses of RHD splice site variants: Insights into the potential role of splicing in the physiology of Rh. *Transfusion*, 55(6pt2), 1432–1443. <https://doi.org/10.1111/trf.13083>

Fichou, Y., Le Maréchal, C., Scotet, V., Jamet, D., & Férec, C. (2016). Insights into RHCE molecular analysis in samples with partial D variants: The experience of Western France. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 42(6), 372–377. <https://doi.org/10.1159/000382086>

Flegel, W. A. (2006). How I manage donors and patients with a weak D phenotype. *Current Opinion in Hematology*, 13(6), 476–483. <https://doi.org/10.1097/01.moh.0000245694.70135>.

Flegel, W. A. (2011). Molecular genetics and clinical applications for RH. *Transfusion and Apheresis Science: Official Journal of the World Apheresis Association: Official Journal of the European Society for Haemapheresis*, 44(1), 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2010.12.013>

Flegel, W. A., Denomme, G. A., Queenan, J. T., Johnson, S. T., Keller, M. A., Westhoff, C. M., Katz, L. M., Delaney, M., Vassallo, R. R., Simon, C. D., & Sandler, S. G. (2020). It's time to phase out “serologic weak D phenotype” and resolve D types with RHD genotyping including weak D type 4. *Transfusion*, 60(4), 855–859. <https://doi.org/10.1111/trf.15741>

BIBLIOGRAFÍA

- Floch, A., Galochkina, T., Pirenne, F., Tournamille, C., & de Brevern, A. G. (2024). Molecular dynamics of the human RhD and RhAG blood group proteins. *Frontiers in Chemistry*, 12, 1360392. <https://doi.org/10.3389/fchem.2024.1360392>
- Floch, A., Pirenne, F., Barrault, A., Chami, B., Toly-Ndour, C., Tournamille, C., & de Brevern, A. G. (2021). Insights into anti-D formation in carriers of RhD variants through studies of 3D intraprotein interactions. *Transfusion*, 61(4), 1286–1301. <https://doi.org/10.1111/trf.16301>
- Fung, Mark K. Eder, Anne F. Spitalnik, Steven Westhoff, Connie M. . (2020) Technical Manual 20th. ed. American Association of Blood Banking.
- Gowland, P., Gassner, C., Hustinx, H., Stolz, M., Gottschalk, J., Tissot, J.-D., Thierbach, J., Maier, A., Sigurdardottir, S., Still, F., Fontana, S., Frey, B. M., & Niederhauser, C. (2014). Molecular RHD screening of RhD negative donors can replace standard serological testing for RhD negative donors. *Transfusion and Apheresis Science: Official Journal of the World Apheresis Association: Official Journal of the European Society for Haemapheresis*, 50(2), 163–168. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2014.02.009>
- Gu, J., Wang, X., Shao, C., Wang, J., Sun, A., Huang, L., & Pan, Z. (2014). Molecular basis of DEL phenotype in the Chinese population. *BMC Medical Genetics*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2350-15-54>
- Hult, A. K. (2018). Flow cytometry in transfusion medicine: an overview. *ISBT Science Series*, 13(1), 3–10. <https://doi.org/10.1111/voxs.12365>
- Hutchison, C. J., Srivastava, K., Polin, H., Bueno, M. U., & Flegel, W. A. (2023). Rh flow cytometry: An updated methodology for D antigen density applied to weak D types 164 and 165. *Transfusion*, 63(11), 2141–2151. <https://doi.org/10.1111/trf.17543>
- Izard, C., Laget, L., Beley, S., Bichel, N., Boisgrollier, L. D., Picard, C., & Chiaroni, J. (2024). Julie Di Cristofaro, Resolution of RHCE Haplotype Ambiguities in Transfusion Settings. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(11). <https://doi.org/10.3390/ijms25115868>
- Jeong, D., Oh, S., Song, E. Y., Hong, Y. J., & Park, K. U. (2021). Molecular characteristics of the serological weak D phenotype in Koreans. *Diagnostics*, 11(6), 920. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11060920>
- Ji, Y. L., Luo, H., Wen, J. Z., Haer-Wigman, L., Veldhuisen, B., Wei, L., Wang, Z., Ligthart, P., Lodén-Van Straaten, M., Fu, Y. S., Schoot, C. E., & Luo, G. P. (2017). *RHD genotype and zygosity analysis in the Chinese Southern Han D+, D- and D variant donors using the multiplex ligation-dependent probe amplification assay (Vol. 112)*
- Kahwash, E., Leonard, J., & Lockwood, W. (2004). A 60-year-old Rh(D)-positive women with anti-D in her serum. *Lab Med*, 35(7), 413–414.
- Kumpel, B. (2006). Are weak D RBCs really immunogenic? *Transfusion*, 46(6), 1061–1062. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2006.00847.x>
- Miranda, M. R., Dos Santos, T. D., & Castilho, L. (2021). Systematic RHD genotyping in Brazilians reveals a high frequency of partial D in transfused patients serologically typed as weak D. *Transfusion and Apheresis Science: Official Journal of the World Apheresis Association: Official Journal of the European Society for Haemapheresis*, 60(6), 103235. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2021.103235>
- Núñez-Ahumada, M. A., Pontigo-González, F., Farías-Peñailillo, S., Villalobos-Pavez, C., Saa-Díaz, E., Canals-Cifuentes, A., & Rojas-Tapia, I. (2023). Genotificación del gen RHD en AD N fetal libre en plasma de embarazadas RhD negativo. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, 88(3). <https://doi.org/10.24875/rechog.22000106>
- Orzińska, A., Guz, K., Polin, H., Pelc-Kłopotowska, M., Bednarz, J., Gieleżyńska, A., Śliwa, B., Kowalewska, M., Pawłowska, E., Włodarczyk, B., Malaga, M., Żmudzin, A., Krzemienowska, M., Srivastava, K., Michalewska, B., Gabriel, C., Flegel, W. A., & Brojer, E. (2013). Ewa Brojer, variants in Polish blood donors routinely typed as D. *Transfusion*.
- Papasavva, T., Martin, P., Legler, T. J., Liasides, M., Anastasiou, G., Christofides, A., Christodoulou, T., Demetriou, S., Kerimis, P., Kontos, C., Leontiadis, G., Papapetrou, D., Patroclos, T., Phylaktou, M., Zottis, N., Karitzie, E., Pavlou, E., Kountouris, P., Veldhuisen, B., ... Kleanthous, M. (2016). Prevalence of RhD status and clinical application of non-invasive prenatal determination of fetal RHD in maternal plasma: a 5 year experience in Cyprus. *BMC Research Notes*, 9(1), 198. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2002-x>
- Pham, B.-N., Roussel, M., Peyrard, T., Beolet, M., Jan-Lasserre, V., Gien, D., Ripaux, M., Bourgoïn, S., Kappler-Gratias, S., Rouger, P., & Le Pennec, P.-Y. (2011). Anti-D investigations in individuals expressing weak D Type 1 or weak D Type 2: allo- or autoantibodies?: ANTI-D IN WEAK D TYPE 1 OR 2 INDIVIDUALS. *Transfusion*, 51(12), 2679–2685. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03207.x>
- Picchiassi, E., Di Renzo, G. C., Tarquini, F., Bini, V., Centra, M., Pennacchi, L., Galeone, F., Micanti, M., & Coata, G. (2015). Non-invasive prenatal RHD genotyping using cell-free fetal DNA from maternal plasma: An Italian experience. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 42(1), 22–28. <https://doi.org/10.1159/000370233>

- Polin, H., Wenighofer, B., Polonyi, N., & Danzer, M. (2024). Evaluation of the LightCycler® PRO instrument as a platform for Rhesus D typing. *Biomedicines*, 12(8), 1785. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12081785>
- Prasad, M. R., Krugh, D., Rossi, K. Q., & O'Shaughnessy, R. W. (2006). Anti-D in Rh positive pregnancies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 195(4), 1158–1162. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2006.06.008>
- Raud, L., Férec, C., & Fichou, Y. (2017). From genetic variability to phenotypic expression of blood group systems. *Transfusion Clinique et Biologique: Journal de La Societe Francaise de Transfusion Sanguine*, 24(4), 472–475. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2017.06.011>
- Raud, Loann, Ka, C., Gourlaouen, I., Callebaut, I., Férec, C., Le Gac, G., & Fichou, Y. (2019). Functional analysis of novel RHD variants: splicing disruption is likely to be a common mechanism of variant D phenotype: SPLICING DEFECT AND VARIANT D PHENOTYPE. *Transfusion*, 59(4), 1367–1375. <https://doi.org/10.1111/trf.15210>
- Raud, L., Tertre, M. L., Vigneron, L., Ka, C., Richard, G., Callebaut, I., Chen, J., Férec, C., Gac, G. L., & Fichou, Y. (2021). Missense RHD single nucleotide variants induce weakened D antigen expression by altering splicing and/or protein expression. *Transfusion*, 61(8), 2468–2476. <https://doi.org/10.1111/trf.16538>
- Sandler, S. G., Chen, L. N., & Flegel, W. A. (2017). Serological weak D phenotypes: a review and guidance for interpreting the RhD blood type using the RHD genotype. *British Journal of Haematology*, 179(1), 10–19. <https://doi.org/10.1111/bjh.14757>
- Sandler, S. G., Flegel, W. A., Westhoff, C. M., Denomme, G. A., Delaney, M., Keller, M. A., Johnson, S. T., Katz, L., Queenan, J. T., Vassallo, R. R., & Simon, C. D. (2015). It's time to phase in RHD genotyping for patients with a serologic weak D phenotype. *Transfusion*, 55(3), 680–689. <https://doi.org/10.1111/trf.12941>
- Sandler, S. G., Li, W., Langeberg, A., & Landy, H. J. (2012). New laboratory procedures and Rh blood type changes in a pregnant woman. *Obstetrics and Gynecology*, 119(2 Pt 2), 426–428. <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e31823f6f76>
- Sandler, S. G., & Queenan, J. T. (2017). A guide to terminology for Rh immunoprophylaxis. *Obstetrics and Gynecology*, 130(3), 633–635. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000002190>
- Sandler, S. G., Roseff, S. D., Domen, R. E., Shaz, B., & Gottschall, J. L. (2014). Policies and Procedures Related to Testing for Weak D Phenotypes and Administration of Rh Immune Globulin: Results and Recommendations Related to Supplemental Questions in the Comprehensive Transfusion Medicine Survey of the College of American Pathologists. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 138(5), 620–625. <https://doi.org/10.5858/arpa.2013-0141-cp>
- Shao, L.-N., Zheng, Z.-W., Zhou, S.-H., Zhang, S.-T., Song, W.-Q., Xia, Y.-X., & Liang, X.-H. (2023). Polymorphisms in the promoter regions of RHD and RHCE genes in the Chinese Han population. *Vox Sanguinis*, 118(11), 972–979. <https://doi.org/10.1111/vox.13522>
- Silvy, M., Chapel-Fernandes, S., Callebaut, I., Beley, S., Durousseau, C., Simon, S., Lauroua, P., Dubosc-Marchenay, N., Babault, C., Mouchet, C., Ferrera, V., Chiaroni, J., & Bailly, P. (2012). Characterization of novel RHD alleles: relationship between phenotype, genotype, and trimeric architecture. *Transfusion*, 52(9), 2020–2029. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03544.x>
- Srivastava, K., Polin, H., Sheldon, S. L., Wagner, F. F., Grabmer, C., Gabriel, C., Denomme, G. A., & Flegel, W. A. (2016). The DAU cluster: a comparative analysis of 18 RHD alleles, some forming partial D antigens. *Transfusion*, 56(10), 2520–2531. <https://doi.org/10.1111/trf.13739>
- Sørensen, K., Kjeldsen-Kragh, J., Husby, H., & Akkök, Ç. A. (2018). Determination of fetal RHD type in plasma of RhD negative pregnant women. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 78(5), 411–416. <https://doi.org/10.1080/00365513.2018.1475681>
- Stanic, H. S., Dogic, V., Herceg, I., Jagnjic, S., Bingulac-Popovic, J., Babic, I., Corusic, A., & Jukic, I. (2020). D variants in the population of D-negative blood donors in the north-eastern region of Croatia. *Transfusion Medicine*, 31(1), 43–47. <https://doi.org/10.1111/tme.12726>
- Stensrud, M., Bævre, M. S., Alm, I. M., Wong, H. Y., Herud, I., Jacobsen, B., de Vos, D. D. J. A., Stjern, H. E., Sørvoll, I. H., Barane, J. B., Bagås, T. E., Rasmussen, M., Ulvahaug, N., Wamstad, V., Tomter, G., & Akkök, C. A. (2023). Terminating routine cord blood RhD typing of the newborns to guide postnatal anti-D immunoglobulin prophylaxis based on the results of fetal RHD genotyping. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 50(4), 276–281. <https://doi.org/10.1159/000531694>
- Thongbut, J., Raud, L., Férec, C., Promwong, C., Nuchnoi, P., & Fichou, Y. (2020). Comprehensive molecular analysis of serologically D-negative and weak/partial D phenotype in Thai blood donors. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 47(1), 54–60. <https://doi.org/10.1159/000499087>
- Toly-Ndour, C., Huguet-Jacquot, S., Mailloux, A., Delaby, H., Canellini, G., Olsson, M. L., Wikman, A., Koelewijn, J. M., Minon, J., Legler, T. J., Clausen, F. B., Lambert, M., Ryan, H., Bricl, I., Hasslund, S., Orzinska, A., Guz, K., Uhrynowska, M., Matteocci, A., . . . Van Der Schoot, C. E. (2020). Rh disease prevention: the European Perspective. *ISBT Science Series*, 16(1), 106–118. <https://doi.org/10.1111/voxs.12617>

Caso clínico

Wagner, F. F., Frohmajer, A., Ladewig, B., Eicher, N. I., Lonicer, C. B., Müller, T. H., Siegel, M. H., & Flegel, W. A. (2000). Weak D alleles express distinct phenotypes. *Blood*, 95(8), 2699–2708. https://doi.org/10.1182/blood.v95.8.2699.008k12_2699_2708

Wagner, T., Korm Oczi, G. F., & Buchta, C. (2005). Anti-D immunization by DEL red blood cells. *Transfusion*, 45(4), 520–526.

Yasuda, H., Ohto, H., Sakuma, S., & Ishikawa, Y. (2005). Secondary anti-D immunization by Del red blood cells. *Transfusion*, 45(10), 1581–1584. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2005.00579.x>

Yin, Q., & Flegel, W. A. (2021). DEL in China: the D antigen among serologic RhD-negative individuals. *Journal of Translational Medicine*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-021-03116-6>