

## **VARIANTES ANTI-D DEL GRUPO SANGUÍNEO. REVISIÓN A PROPÓSITO DE UN CASO**

### **AUTORES:**

**Luisa Marlen Viñet Espinosa<sup>1</sup>, José A. Barnés Domínguez<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Especialista en Medicina General Integral y Fisiología Normal y Patológica, Hospital Ortopédico Fructuoso Rodríguez. Profesor Asistente ELAM.

<sup>2</sup>Especialista en Medicina General Integral y Medicina Interna, Instituto de Angiología, Profesor auxiliar ELAM.

### **RESUMEN**

**Introducción:** Los sistemas de antígenos sanguíneos ABO y Rh son los de mayor significación en los humanos y los tipificados con mayor frecuencia en la práctica clínica diaria y para las transfusiones de sangre. **Objetivo:** Interpretar la importancia de los anticuerpos monoclonales en la identificación de las variantes anti-D del Grupo Sanguíneo. **Presentación de caso y Discusión:** se presenta el caso de una paciente que en las 5 gestaciones precedentes presentaba un grupo sanguíneo A Rh negativo y que en los análisis de su sexta gestación se informó A Rh positiva. Luego de repetirse el examen con anticuerpos monoclonales se obtuvo la presencia de una variante D, lo que unido a una revisión de la literatura permitió llegar a las conclusiones siguientes: el sistema Rh es muy complejo en cuanto a su genética, nomenclatura e interacciones antigénicas, lo cual puede generar dificultades en su tipificación ante la presencia de variantes D. Los individuos RhD positivo, pero con D parcial o variante de D, pueden producir anticuerpos anti-D, similar a la de los sujetos Rh negativo. Esta situación pudo ser responsable del diagnóstico Rh negativo que tuvo esta paciente en sus embarazos anteriores. **Conclusiones:** Sin dudas la introducción de los anticuerpos monoclonales permitió esclarecer el diagnóstico de la variante anti-D en este caso.

**Palabras clave:** Sistema ABO, sistema Rhesus, anticuerpos monoclonales, grupos sanguíneos.

### **INTRODUCCIÓN**

La forma de agrupar ciertas características de la sangre según la presencia o ausencia de determinados antígenos en la superficie de los eritrocitos se denomina Grupo sanguíneo, el primero de ellos se describe en el año 1900 por Karl Landsteiner, médico patólogo que lo denominó ABO; pero es importante conocer que las propiedades antigénicas de la sangre son distintas en cada individuo, de hecho 430 antígenos eritrocitarios están clasificados como colecciones, antígenos de alta incidencia, antígenos de baja incidencia y 33 sistemas, de los cuales el ABO y Rh son los de mayor significación en los humanos y los tipificados con mayor frecuencia en la práctica clínica diaria y para las transfusiones de sangre.<sup>1-4</sup>

El sistema de grupos sanguíneos ABO tiene gran importancia en distintas ciencias y campos como en la medicina transfusional, en los trasplantes de órganos, la obstetricia, neonatología y en medicina legal; además los antígenos eritrocitarios se utilizan como marcadores genéticos en estudios poblacionales, familiar y de clasificación fenotípica.<sup>4-8</sup>

Los anticuerpos humanos contra el antígeno D se identifican por vez primera en el año 1939 por Levine y Stetson, en el suero de una mujer que tras el parto de su segundo hijo (este con anemia hemolítica) ella recibe una transfusión de sangre de su marido que originó, en la mujer, una reacción hemolítica a partir de un anticuerpo distinto y potente, capaz de destruir los eritrocitos del padre aun ante la presencia de compatibilidad del sistema ABO.<sup>1,3</sup>

Un año después en 1940 Landsteiner y Wiener inyectan eritrocitos de *Maccacus Rhesus* (variedad de mono Rhesus: *Maccacus Mulatta*) a conejos y cobayos, tras este hecho en el suero de los animales inmunizados se observa la presencia de anticuerpos con la capacidad de aglutinar no solo los hematíes del primate, sino también los eritrocitos del 85% de la sangre humana. Desde entonces las personas cuyos eritrocitos aglutinan con el suero anti-Rhesus se designan como Rh positivos y si los eritrocitos que no aglutinan son Rh negativos.<sup>1,3</sup>

En 1961 se determina que los antígenos detectados por los sueros anti-Rhesus animales y anti-D humanos no eran iguales, pero para entonces el uso del término Rh en la trasfusión humana se generaliza tanto que resulta imposible de sustituir, entonces Levine propone denominar al anticuerpo antiRhesus de conejo el nombre de anti-LW en honor a sus descubridores.<sup>1,3</sup>

El primer antígeno que se descubre del Sistema R es el D; a mediados de los años 40 se identifican cuatro antígenos adicionales (C, c, e y E) que forman parte del polimorfismo del sistema Rh. Hallazgos ulteriores elevan el número de antígenos relacionados con el sistema Rh, muchos de los cuales exhiben variaciones cualitativas y cuantitativas; pero se mantienen los antígenos D, C, c, E, e y sus respectivos anticuerpos como los responsables de más del 99% de los eventos clínicos que involucran al sistema Rh.<sup>1,3</sup>

Existen dos teorías sobre el origen genético de los antígenos del sistema Rh. La teoría de Fisher y Race proponen la existencia de 3 genes, aunque muy cerca el uno del otro y localizados en el mismo cromosoma, pero que son independientes entre sí, que son: D, C y E. Los alelos correspondientes se designan c y e. Todos los antígenos se descubren a través del anticuerpo excepto el Anti-d, porque continúa sin identificarse el alelo de D, por cuanto d se usa para denominar ausencia de D. Del otro lado la teoría de Wiener designa un nombre para cada haplotipo, usa la letra mayúscula R para los D positivo y la r en minúscula para los haplotipos D negativo. La letra se acompaña de un número (0,1,2) o de un carácter (', ') para definir la presencia o ausencia de los otros cuatro antígenos mayores. Aunque sigue siendo habitual el uso de la nomenclatura de Fisher en la escritura ordinaria, y la nomenclatura de Wiener en el lenguaje oral, con las sucesivas investigaciones existen otras como la de Tippett y Sanger que los clasificaron en categorías I-VI, sin que hasta la fecha exista un acuerdo para el uso de una nomenclatura única internacional.<sup>1,3,9</sup>

Los anticuerpos del sistema Rhesus se producen en forma de anticuerpos completos (IgM o incluso IgA), o como anticuerpos incompletos (IgG) que resultan más frecuentes, ellos estimulan su producción por transfusión o por embarazo. No activan el complemento porque la situación de los antígenos Rhesus en la membrana de los eritrocitos impide la formación de dobletes de IgG necesarios para la activar el mismo.

Los fenotipos Rh expresan los antígenos que están presentes en el hematíe, estos antígenos son producidos de dos en dos por los diferentes haplotipos, el producto de estos genes pueden ser homocigotos (D, D; C, C; E, E) o heterocigotos (D, d; c, C; e, E). El gen RHc codifica los productos c y e, el gen RHCe codifica los productos

C y e, el gen RhcE codifica los productos c y E; y el gen RHCE codifica los productos C y E que son excepcionales. Las combinaciones de estos genes originan para los sujetos Rh positivos CCDEE, CCDEe, CCDee, CcDEE, CcDEe, CcDee, ccDEE, ccDEe y ccDee, para los sujetos con Rh negativo CCdEE, CCdEe, CCDee, CcdEE, CcdEe, Ccdee, ccdEE, ccdEe y ccdee.<sup>1,3</sup>

Para poder establecer el genotipo a partir del fenotipo hay que determinar primero los cinco antígenos C, c, D, E, e y luego establecer si el fenotipo es Rh positivo o negativo. Si es Rh negativo, se acepta que es homocigoto para dd. En ausencia de C, se anota c en cada cromosoma (c/c), si es CC se coloca C en cada cromosoma (C/C) y si tiene C y c se coloca C en el primer cromosoma y c en el segundo cromosoma (C/c). Se inscribe la D en el mismo cromosoma donde esta C.<sup>1,3</sup>

Para determinar la presencia o ausencia de E, se tiene en cuenta que si está presente e, e se coloca una en cada cromosoma (e/e), si EE se coloca una en cada cromosoma (E/E) y la existencia de E, e se anota E en el primer cromosoma y e en el segundo cromosoma. Se ubica la E en el mismo cromosoma donde está D, a menos que ya exista una C. No existe el antígeno d, pero esta letra significa la ausencia de D y se emplea para definir el fenotipo Rh negativo.<sup>1,3,9</sup>

El sistema Rh y su determinación representan un papel importante en la Obstetricia, las madres Rh negativas al ser sensibilizadas por antígenos eritrocitarios de un producto Rh positivo, producirán anticuerpos Anti-Rh que al cruzar la barrera placentaria pueden producir hemólisis de eritrocitos fetales, causando la enfermedad hemolítica del recién nacido.<sup>7</sup>

## **OBJETIVO**

Mostrar la importancia para los médicos de la interpretación adecuada de las técnicas de determinación del factor Rh con D variante.

## **PRESENTACIÓN DE CASO**

Paciente femenina, 28 años de edad, antecedentes de gesta 6, para 5, que acude a consulta de evaluación post-captación de su sexto embarazo y al revisar los exámenes complementarios todos resultan en valores normales. Al analizar la historia obstétrica anterior buscando identificar factores de riesgo, en embarazos anteriores aparece una contradicción: se recibe el resultado del Grupo sanguíneo A,

con Factor Rh (+); pero en todos los embarazos anteriores el Grupo sanguíneo de la paciente siempre fue informado A, con factor Rh (-).

En un interrogatorio exhaustivo la paciente tiene antecedentes patológicos familiares negativos, antecedentes personales negativos de: anemia, enfermedades o terapias inmunes, hábitos tóxicos, uso de medicamentos, que nunca fue sometida a ninguna intervención quirúrgica, no fue donante ni había recibido transfusiones u otro proceder médico o derivado de su estilo de vida que pudiera involucrar un caso particular o excepcional.

Surge entonces la siguiente interrogante científica ¿Es posible que una paciente en menos de 2 años pueda tener otro Factor RH sanguíneo?

### **ANÁLISIS Y DISCUSIÓN**

El primer razonamiento lógico es pensar que se trate de un error en la identificación del antígeno Rh, lo cual usualmente puede ser por: <sup>10-12</sup>

**Causas de falso positivo:** la adición del antisuero equivocado al tubo de prueba, el exceso de centrifugación de la mezcla suero/células, material de vidrio sucio (lejía, detergente, silicona) o la técnica de lectura inadecuada, agitación muy débil.

**Posibles causas de falso positivo o falso negativo:** rotulado incorrecto de los tubos, adición equivocada de un antisuero al tubo de prueba, errores en la lectura o interpretación de resultados, registro inexacto de los resultados, contaminación de antisuero o células de prueba o una inexacta relación suero/células en la mezcla de prueba.

### **Conducta a seguir**

Ante estas posibles causas la conducta a seguir fue repetir el examen con la técnica de anticuerpos monoclonares. El resultado obtenido fue el siguiente:

Anticuerpos Monoclonares y sus respectivos linajes celulares

Anti-A .....A5

Anti-B.....G ½

Anti-DVI.....LHM59/20(LDM3)+175-2

Anti-D.....ESD1(IgG)

Método: Gel test

Observación: Presencia de D variante.

Lo anterior muestra la existencia de alteraciones cualitativas en los epítetos 3,6,9 de las membranas de los eritrocitos identificados

## **DISCUSIÓN**

El antígeno RhD presenta un extenso polimorfismo. Puede presentarse como un antígeno con pobre expresión (D débil) o como un antígeno modificado (D parcial), características que en la mayoría de las situaciones solo pueden ser determinadas por estudios moleculares.<sup>9,10</sup>

La existencia del polimorfismo del antígeno RhD causa dificultades en su clasificación; de hecho el reconocimiento de muestras con pobre expresión del antígeno RhD depende del método y de la calidad del reagente anti-D empleado, por lo que se considera que el surgimiento de los reagentes monoclonares y el desarrollo de las técnicas moleculares son una gran contribución para el esclarecimiento de las diferentes formas de expresión de antígenos RhD.<sup>9,10</sup>

El D débil es definido como un fenotipo que desde el punto de vista cuantitativo pero no cualitativo tiene una menor expresión del antígeno D y responden a varias circunstancias genéticas. Algunos genes RhD pueden codificar para una expresión debilitada del antígeno D. Este tipo parece ser más frecuente en la raza negra,<sup>11</sup> y tiene lugar como parte del haplotipo cDe.

Otro de los fenómenos bien conocidos es el debilitamiento del antígeno D por la presencia del gen C en posición trans con respecto al D, o sea en el cromosoma opuesto. Los hematíes que muestran este efecto son generalmente de genotipo CDe/Ce.<sup>11</sup>

Los sujetos con D débil, particularmente los que poseen menos de 400 sitios antigénicos, luego de la exposición a eritrocitos Rh positivo pueden desarrollar anti-D. La sustitución de aminoácidos en la variante D débil, se puede localizar en los segmentos de proteínas de transmembrana e intracelulares, así como en los racimos de 4 regiones de la proteína (aminoácidos en la posición 2 a 12, alrededor de la 149, así como los aminoácidos 179 a 225 y los aminoácidos 267 a 397). Esta observación implica que los sujetos con fenotipo D débil (no todos) pero sí en los que se da esta situación, es debido a una alteración cuantitativa de la proteína RhD.

<sup>11,12</sup>

Existen personas RhD positivo; pero con D parcial o variante de D, que pueden producir anticuerpos anti-D, similar a la de los sujetos Rh negativo. Se ha descrito que la base molecular principal ocurre usualmente por conversión de genes, donde parte del gen RhD es sustituido por sus respectivos segmentos del gen RhCE en una simple mutación sin sentido. En sujetos de raza negra de origen africano, debido a la presencia de alelos aberrantes del RHD (DAU-0 a DAU-4, Thr379met) es posible observar mayor frecuencia el desarrollo de anti-D en sujetos Rh positivo. Los fenotipos variantes de D, del 1 al 7, D(II) y DFR, pueden desarrollar, posterior a un embarazo o transfusión incompatible. Los eritrocitos de estas variantes no expresan nueve determinantes (epD1 a epD9), los cuales normalmente son componente la estructura del mosaico D.<sup>13</sup>

El hecho de que algunos individuos D positivos sean capaces de producir anti-D condujo al descubrimiento de que el antígeno D se compone de varios fragmentos, o epítomos, con un número mínimo reconocido de nueve, alguno de los cuales puede estar ausente, con la posibilidad de producir el anticuerpo correspondiente a ese fragmento por un individuo clasificado como D positivo. Antes, estas células se denominaban D mosaico o D variante, y en la actualidad se conocen como D parcial.<sup>13</sup>

Las fronteras que separan los criterios de clasificación de las bases moleculares de los fenotipos D parcial y D débil cada vez son más virtuales pues, en los últimos años las investigaciones señalan que algunos fenotipos D parcial son debidos a mutaciones puntuales y no solo a fenómenos de recombinación genética, tal como sucede con los fenotipos D débil. Por otro lado señalan que, aunque en la mayoría de los fenotipos D débil descritos no se ha detectado aloinmunización anti-D, ésta ya no se considera patrimonio exclusivo de los fenotipos D parcial, y se han publicado ejemplos de individuos de fenotipo D débil portadores de de anti-D. De la misma forma existen numerosos fenotipos D parcial en los que nunca se ha documentado aloinmunización anti-D, probablemente porque los epítomos de los que carecen son poco o nada inmunogenicos.<sup>1,9,13</sup>

Según Campos y colaboradores conocer las variantes de D en los pacientes y los donadores es importante porque las aloimmunizaciones del anti-D pueden ocurrir

en algunos; pero no en todas las personas que expresan un alelo de Rh D variante.<sup>13</sup>

En el caso de las gestantes portadoras de una variante D y/o sensibilizadas pueden producir enfermedad hemolítica del recién nacido grave en el feto e incluso ocasionar la muerte fetal porque existe el riesgo en estos pacientes de aloinmunización anti D, de ahí la importancia del control y seguimiento inmunohematológico en las embarazadas candidatas para recibir la dosis de gammaglobulina anti-D.<sup>14,15</sup>

### **Tipificación del sistema Rhesus**

En la actualidad se dispone de reactivos anti-D monoclonales. Las pruebas pueden utilizar glóbulos suspendidos en solución salina, suero o plasma, pero es esencial que se cumplan las instrucciones del fabricante de los reactivos. Los procedimientos para las pruebas en microplacas son similares a aquellas en tubos, pero deben utilizarse suspensiones de glóbulos rojos muy diluidas.<sup>16</sup>

La tipificación Rh de rutina de los donantes y pacientes sólo involucra los antígenos D. La investigación de otros antígenos Rh sólo se efectúa con fines definidos, como la identificación de anticuerpos Rh inesperados, la obtención de sangre compatible para pacientes con anticuerpos Rh entre otras.<sup>16,17</sup>

Se postula que cuando se busca sangre compatible para un receptor con anticuerpos Rh comparativamente débiles, el uso de reactivos potentes para detectar la ausencia del antígeno puede ser más confiable que la prueba de compatibilidad cruzada. La determinación del fenotipo del paciente podría ayudar a confirmar la especificidad de los anticuerpos e indicar la presencia de otros anticuerpos anti-Rh.<sup>11-18</sup>

Según la Asociación Americana de Bancos de Sangre (AABB) se requieren técnicas para mostrar D débil solamente para la sangre de donante o para analizar la sangre de recién nacidos de madres Rh negativo para determinar si son candidatas a recibir inmunoglobulina Rh. Si es preciso investigar antígenos D débil, se lleva a cabo una prueba antiglobulínica. No hay procedimientos en placa para determinar la expresión de D débil que sean confiables.<sup>16</sup>

La evidencia señala que la mayoría de los eritrocitos D positivo muestran aglutinación macroscópica después de la centrifugación con anti-D y resulta fácil

clasificarlos como tales; sin embargo los que no se aglutinan en forma inmediata o directa son los que ofrecen dudas diagnósticas; por lo cual en algunos eritrocitos D positivo, la demostración de antígenos D requiere incubación con anti-D o el agregado ulterior de suero antiglobulínico (AGH) después de la incubación con anti-D (Prueba Indirecta de Antiglobulina) y la detección a través de anticuerpos monoclonales con selección de los reactivos acorde a la población. Existiendo el consenso de que aun cuando la prueba requiere un paso adicional, esos eritrocitos se consideran D positivo.<sup>19</sup>

El hecho de que el fenotipo D positivo es más frecuente en personas afrodescendientes que el D negativo y que las variantes D son más frecuentes en personas de ascendencia Africana y menos comunes en la población europea o asiática son resultado de investigaciones poblacionales que demuestran las diferencias étnicas en la expresión genética de los grupos sanguíneos, lo cual puede ayudar a la selección de los reactivos según esta característica en la población sujeta a estudio.<sup>20-23</sup>

Gracias a los avances logrados en los reactivos policlonales y monoclonales anti-D, es factible detectar algunas células D positivo que habrían sido clasificadas como D débiles cuando se analizaron con reactivos menos sensibles. Por otra parte, los anti-D monoclonales podrían reaccionar por aglutinación directa con epítomos del antígeno D que antes requerían métodos más sensibles para reaccionar o, en ocasiones, podrían no reaccionar con otros epítomos de los antígenos D. A la inversa, con la prueba directa algunos anti-D monoclonales pueden reaccionar con epítomos raros de antígeno D que no se habían podido detectar con reactivos policlonales (por ejemplo, DHAR y Crawford). Es importante conocer que los reactivos anti-D varían entre los distintos fabricantes y esas diferencias deben ser conocidas por los usuarios.<sup>9,13,24</sup>

Se sabe que entre los individuos con fenotipos D parciales las expresiones más inmunogénicas son las categorías DIV, DV y DVII, que son detectables como D positivos por los reactivos convencionales clase IgG, mientras que la categoría DVI es la menos inmonogénica y esto provoca errores en la clasificación de estos donantes.<sup>9</sup>

En el caso de una gestante RhD-negativa o con variante D como el antígeno D débil, se encuentra en riesgo de sensibilización si el feto es RhD-positivo y puede desarrollar Enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN).<sup>10,25</sup>

Para las determinaciones de tipificación del sistema Rhesus se emplean de forma tradicional métodos en portaobjetos, tubo y actualmente pruebas en gel o micro columnas así como en micro placa; en estos últimos permiten la automatización de los procedimientos para garantizar la calidad de los resultados obtenidos en cada una de las pruebas. Ante esta posibilidad, cuando no se tienen de técnicas específicas de detección de variantes D, de desarrollar EHRN es que la paciente de este estudio fue informada erróneamente como Rh negativa en sus gestaciones precedentes.

## CONCLUSIONES

- EL sistema Rh es muy complejo en cuanto a su genética, nomenclatura e interacciones antigénicas, lo cual puede generar dificultades en su tipificación ante la presencia de variantes D.
- Los individuos RhD positivo, pero con D parcial o variante de D, pueden producir anticuerpos anti-D, similar a la de los sujetos Rh negativo. Esta situación pudo ser responsable del diagnóstico Rh negativo que tuvo esta paciente en sus embarazos anteriores.
- Sin dudas la introducción de los anticuerpos monoclonales permitió esclarecer el diagnóstico de la variante anti-D en este caso.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Muñoz Díaz E, Nogués N, Montero R, Canals C. Grupos sanguíneos eritrocitarios en: Cortes A, León G, Muñoz M, Jaramillo S. Aplicaciones y práctica de la medicina transfusional. 1ra Ed. Cali. 2012. pp127-137.
2. Azurduy Antelo D, Navarro Ramírez R. Frecuencia de grupos sanguíneos ABO y factor RhD en donantes del banco de sangre departamental Tarija, gestiones 2014-2017. Investigación en Salud. 2019; 1 (1): 41- 48
3. Jaime Pérez J C, Salinas Carmona M C. Introducción a la medicina de transfusión. En: Jaime Pérez J C, Gómez Almaguer D. Hematología, la

- sangre y sus enfermedades. McGRAW-HILL Interamericana. 3ra Ed. México. 2012.pp 203-206
4. Bethesda MD, American Association of Blood Banks. Standards for Blood Banks and Transfusion Services. 31st ed. 2018.
  5. American Red Cross. RBC Compatibility Table. ARD, 2019 [Internet]. 2019 [citado 6 de Abr 2020]. disponible en [http://:www.redcrossblood.org](http://www.redcrossblood.org)
  6. Bencomo Hernández AA, Aquino Rojas S, González Díaz I, Chang Monteagudo A, Morera Barrios L M, Rodríguez Leyva R. Caracterización de los antígenos y anticuerpos eritrocitarios en pacientes en espera de trasplante renal. Rev. Cub. de Hemat, Inmunol y Hemot. 2016, 32 (2): 223-235.
  7. Haspel RL, Westhoff CM. How do I manage Rh typing in obstetric patients? Transfusion 2015; 55: 470-4.
  8. Flegr J. Heterozygote advantage probably maintains rhesus factor blood group polymorphism: ecological regression study. PLoS ONE. 2016;11:e0147955.
  9. Rivero Jiménez René A. Anticuerpos monoclonales anti-Rh(D): antecedentes y estado actual. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. [Internet]. 2000 Abr [citado 2020 Abr 23]; 16 (1): 30-37. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-02892000000100003&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892000000100003&lng=es)
  10. Cortez A, Muñiz E, Leon G. Inmunohematología Básica y Aplicada. 1ra Edición. Colombia. Feriva S.A. Cali. 2014.
  11. Gaspardi A, Sippert E, Dorigan M, Pellegrino J, Costa F, Castilho L. Clinically relevant RhD-CE genotypes in patients with sickle cell disease. Blood Transfusion. 2016; 14(5): 449-454.
  12. Yazer M, Bruncker P, Bakdash S, Tobian A, Triulzi D, Earnest V, et al. Low incidence of D alloimmunization among patients with a serologic weak D phenotype after D+ transfusion. Transfusion. 2016, 56 (10): 2502-2509.
  13. Campos FC, Mota MA, Aravechia MG, Torres KB, Bub CB, Kutner JM, Castilho L. Variant RHD Types in Brazilians With Discrepancies in RhD Typing. J Clin Lab Anal. 2016 Nov; 30(6):845-848.

14. Sadler G, Chen L, Flegel W. serological weak D phenotypes. A review and guidance for interpreting the RhD blood type using the RHD genotype. *British journal of Hematology*. 2017: 10-19
15. Luo X, Keller M, James I, Grant M, Liu S, Massey K 1, et al. Strategies to identify candidates for D variant genotyping. *Blood Transfus* 2018; 16(3): 293-301.
16. Bethesda MD: American Association of Blood Banks Technical Manual. 19th ed. 2018
17. Westhoff CM, Siegel DL. Rh and LW blood group antigens. In: Rossi's principles of transfusion medicine. Chichester, WestSussex: John Wiley & Sons, Ltd.; 2016. p. 176-84.
18. Sandler SG, Flegel WA, Westhoff CM, et al. It's time to phase in RHD genotyping for patients with a serologic weak D phenotype. College of American Pathologists Transfusion Medicine Resource Committee Work Group. *Transfusion*. 2015;55:680-9.
19. Dava N, Upadhyaya A, Agarwal N, Mehta A, Choudhary V, Goyal G. A rare case of hemolytic disease of newborn due to weak D (D unknown) antigen in child. *Asian Journal of Transfusion Science*. 2018; 12(1): 75-77
20. Ojok P, Oyet C, Webbo F, Nwambi B, Taremwa I. prevalence of RhD variants among blood donors at Gulu Regional Blood bank, Gulu, Northern Uganda. *Journal of Blood Medicine*. 2017; 15 (8):151-154
21. Prisco C, Guilhem J, De Paula T, De Medeiros R, Roche F, castillo L. RHCE variants inherited with altered RHD alleles in Brazilian blood donors. *Transfusion Medicine*. 2016; 26(4): 1-6.
22. Zacarías J M, Volkweis I, Iaguala J, Sell A M. Profile of Rh, Kell, Duffy, Kidd and Diego Blood Group Systems among Blood Donors in the Southwest region of the Parana state, Southern Brazil. *Transfusion and Science*. 2016.
23. Flores Bello A, Mas Ponte D, Rosu M E, Bosch E, Calafell F, Comas D. Sequence diversity of the Rh blood group system in Basques. *European Journal of Human Genetics*. 2018; 26: 1859-186.

24. Grupo de Inspección y Vigilancia de Equipos y Dispositivos Médicos. Alerta de seguridad 001/2017. Producto: ior® Hemo-CIM anti-D. [Internet]. 2017 [citado 2020 Abr 23]; Disponible en: <http://www.cecmed.cu>
25. The Australian & New Zealand Society of Blood Transfusion (ANZSBT). Guidelines for transfusion and immunohaematology laboratory practice. Sydney. 1ra Ed. 2016.