



**COMITÉ DE EDUCACIÓN CONTINUA Y CONTINUADA**

**COORDINADORA: DRA ANA CLAUDIA PERÓN**

**PROGRAMA CONSULTA AL EXPERTO**

**COORDINADORA: DRA GRACIELA LEÓN DE GONZÁLEZ**

**“LA INMUNOHEMATOLOGIA EN LA RELACIÓN FETO MATERNA:**

**Enfermedad Hemolítica y Trombocitopenia Aloimmune fetal y neonatal”**

**PROFESORES INVITADOS: Ana Claudia Peron<sup>1</sup> Leidy Alejandra Toro  
Espinosa<sup>2</sup> Paula Andrea Gaviria García<sup>3</sup> Daniel Alberto Téllez Paz <sup>4</sup>**

1. Bióloga - Universidad Mogi das Cruzes – São Paulo - Brasil - Gerente de Asuntos Científicos en BioRad - División de Inmunohematología y de control de calidad Latinoamérica. Brasil

2. Magister en Microbiología con énfasis en Hematología – Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. Asesora Científica Biocientífica Ltda. Bogotá D.C, Colombia. Docente Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

3. Magister en ciencias biológicas – Pontificia Universidad Javeriana Bogotá D.C, Colombia. Líder de la Unidad de Inmunohematología Avanzada y de la Línea de Investigación en Medicina Transfusional del Instituto Distrital de Ciencia Biotecnología e Innovación en Salud- IDCBIS-. Bogotá D.C, Colombia.

4. Magister en Medicina Transfusional Terapia Celular y Tisular – MBA Especialidad en International Business – Docente Universidad de Antioquia. Bogotá D.C, Colombia.

# LA IMUNOHEMATOLOGÍA EN LA RELACIÓN FETO MATERNA

## 1. Aspectos Históricos de la Enfermedad Hemolítica del Feto y el Recién Nacido:

Los casos de Enfermedad Hemolítica del Feto y el Recién Nacido (**EHFRN**) fueron descritos por primera vez por la partera francesa *Loyse Bourgeois* en 1609 después del nacimiento de unos gemelos con complicaciones clínicas; el primero presentó edema generalizado, hidropesía y muerte; el segundo presentó un cuadro de ictericia severa y murió tres días después (1). En el año 1892, *Ballantyne* publicó su obra "*The diseases and deformities of the foetus*" y describió las características clínicas de los Recién Nacidos (RN) con hidropesía fetal ante la alta incidencia de nuevos casos. Sin embargo, solo hasta el año en 1932 *Diamond* unifica en una sola entidad *hidropesía, icterus gravis neonatorum* y *anemia neonatal* como diferentes fases de una misma enfermedad, todas ellas con la presencia de eritoblastos como punto en común (eritoblastosis fetal) (1). En 1938, siguiendo en la búsqueda de la etiología de la EHFRN, la doctora Ruth Darrow generó hipótesis muy contundentes que explicarían que el "icterus gravis neonatorum" como se conocía para la época, era debido a una reacción antígeno-anticuerpo entre la madre y el RN (2).

En 1940 *Landstainer* y *Wiener* describieron la aglutinación de glóbulos rojos humanos al contacto con suero de conejos inoculados con glóbulos rojos de monos Rhesus, denominando al 85 % de las aglutinaciones como Rh positivo. Un año después *Levine* y *Stetson* publicaron el histórico caso de una madre que después de dar a luz a un RN hidrópico requirió una transfusión de sangre donada por su esposo aparentemente compatible, y posteriormente la madre presentó una reacción hemolítica. Por lo anterior y reconociendo lo descrito se postulaba que el feto expresaba algún antígeno diferente al grupo sanguíneo ABO heredado del padre pero ausente en la madre (3)(4).

En 1946, *Wallerstein* publicó la experiencia con la exanguinotransfusión como único método de tratamiento hasta entonces posible, y que fue ampliamente realizado por *Allen* en 1950 obteniendo la mejoría en la evolución clínica de los RN afectados de la EHFRN relacionado con el sistema RH. Cuatro años más tarde, *Allen* documentó que el nacimiento prematuro disminuye el impacto de las complicaciones clínicas graves de la anemia y la hiperbilirrubinemia. En 1858, *Cremer* publicó su experiencia con la fototerapia tras las observaciones empíricas de la enfermera *Ward* del hospital general de Rochford, Essex (Inglaterra) al notar que los prematuros ictericos que reciben luz solar directa "destiñen" más rápidamente que sus congéneres que no la reciben. En 1961, *Liley* describe su experiencia correlacionando el grado de la enfermedad con los niveles de bilirrubina a la espectrofotometría en líquido amniótico obtenido por amniocentesis sugerido por *Bevis* una década antes (1)(2).

Es de anotar, que a finales de la década de los años 60s, cerca de 200.000 bebés morían en el mundo a causa de la EHFRN por incompatibilidad RhD y una gran proporción de RN que sobrevivían, padecían daños cerebrales y deficiencias irreversibles, pues solo en Estados Unidos se reportaban alrededor de 40.000 casos anuales. Ante estas alarmantes cifras, en 1968 *Jhon Gorman* y *Vince Freda* desafían los caminos de la medicina experimental desarrollando una "antivacuna" como estrategia de inmunización pasiva al inyectar a la madre los mismos anticuerpos Rh que normalmente afectarían al feto neutralizando la propia defensa inmunológica; posteriormente, realizaron pruebas en reclusos voluntarios del centro correccional Sing Sing en Nueva York con resultados satisfactorios demostrando que era posible suprimir la respuesta inmunitaria; posteriormente, *Gorman* probaría su efecto en su cuñada embarazada, replicando los buenos resultados. En 1968 el medicamento RhoGAM finalmente fue aprobado y hasta la actualidad los sueros han salvado millones de vidas afectadas por esta entidad (5).

En 2019, más de 50 años después de la aprobación y uso de la profilaxis anti-D, según datos de la Worldwide Initiative for Rh Disease Eradication | Pathology, debido a la falta de conciencia y acceso

# LA IMUNOHEMATOLOGÍA EN LA RELACIÓN FETO MATERNA

a la atención adecuada, la EHFRN por Rh sigue prevaleciendo en Latinoamérica y otras partes del mundo, lo que ha generado cientos de miles de abortos espontáneos, mortinatos y neonatos con complicaciones y/o secuelas relacionadas con la hiperbilirrubinemia. De hecho, se estima que ~ 50% de las mujeres embarazadas en todo el mundo que necesitan inmunoglobulina Rh (D) no la reciben, lo que equivale a ~ 2.5 millones de mujeres cada año (6).

## 2. Inmunohematología Eritrocitaria:

La inmunohematología eritrocitaria es la ciencia que estudia la compatibilidad sanguínea a través de pruebas de laboratorio que buscan reconocer la presencia de antígenos eritrocitarios y los correspondientes anticuerpos. Dado que la EHFRN es una entidad generada por anticuerpos maternos contra antígenos fetales heredados del padre, las pruebas de inmunohematología eritrocitaria son importantes para identificar procesos de incompatibilidad materno - fetal, a fin de establecer estrategias de seguimiento, terapéutica y pronóstico.

La fase preanalítica de las pruebas de inmunohematología eritrocitaria merece especial atención. Las variables más críticas en esta etapa comprenden: la correcta identificación del paciente y sus muestras, la relación anticoagulante-muestras, la adecuada homogeneización y almacenamiento intermedio de las muestras. Las órdenes médicas deben ser claras, y tener la firma del médico solicitante; así mismo, la disponibilidad de información sobre la historia clínica de las gestantes es importante para una correcta correlación diagnóstica especialmente en los casos que se identifiquen valores críticos.

Respecto a la fase analítica, es de resaltar que la fiabilidad de los resultados depende de que los reactivos empleados en el área sean verificados y controlados a través de un programa de control de calidad interno y externo; de que se sigan las instrucciones de los insertos de los reactivos y de que se desarrolle un plan de aseguramiento metrológico que garantice que los equipos y sistemas están en condiciones óptimas para el correcto procesamiento de pruebas.

## 3. Seguimiento Inmunohematológico de la Embarazada

Existen diversos consensos de expertos y guías clínicas basadas en la evidencia en torno a la importancia de la realización de pruebas inmunohematológicas en el periodo prenatal con el fin de detectar la Isoinmunización Eritrocitaria (**IE**) y prevenir la EHFRN; en esta sección se realizará una revisión sucinta de las recomendaciones más relevantes y al alcance de los laboratorios latinoamericanos para el correcto seguimiento de las gestantes:

### 3.1 Hemoclasificación:

La hemoclasificación permite conocer el grupo sanguíneo ABO y RhD de las gestantes y debe realizarse en el primer trimestre de la gestación con los exámenes de inicio a los programas de atención prenatal; así mismo, se recomienda la confirmación del grupo sanguíneo en la semana 28 para comprobar que el resultado es reproducible y evitar así posibles errores técnicos y logísticos (7).

**La clasificación ABO** comprende la detección de los antígenos ABO mediante la prueba directa y la detección de hemaglutininas en la prueba inversa. La prueba directa debe realizarse utilizando sueros monoclonales anti-A, anti-B con capacidad para detectar los antígenos A, B en la membrana de los glóbulos rojos; la prueba inversa debe realizarse con glóbulos rojos A1 y B buscando los anticuerpos anti-A y anti-B en el plasma materno.

## LA IMUNOHEMATOLOGÍA EN LA RELACIÓN FETO MATERNA

Aunque es conocido que los anticuerpos ABO son predominantemente de la clase IgM y no cruzan la barrera placentaria, está documentado que las mujeres multíparas de grupo O pueden tener altos títulos de Anti-A y anti-B de clase IgG, que pueden atravesar la barrera placentaria y sensibilizar los glóbulos rojos fetales de grupo A o B produciendo hemólisis (8)(9). Es de resaltar, que la presencia de altos títulos de anti-A o anti-B no es exclusivo de mujeres O (10). Por lo expuesto, la identificación de las gestantes O permite implementar estrategias de vigilancia y seguimiento clínico en los RN por lo cual, la hemoclasificación en muestras de cordón umbilical ha sido sugerida en gestantes O para el seguimiento durante el periodo postnatal, como se discutirá más adelante.

La incidencia de embarazos ABO incompatibles notificados por algunos autores es del 15 % al 25 % (11). No obstante, la incompatibilidad por ABO no es descrita como un grave problema en la relación materno-fetal debido a que la mayoría de los casos clínicos son leves, autolimitados y no requieren tratamientos complementarios; los casos de severidad moderada generalmente se resuelven con fototerapia. En un estudio realizado en el sur de la India por *Bhat y Kumar* se observó que la frecuencia de incompatibilidad ABO en embarazadas fue 17,3 % (151/878), de los cuales 50,4 % fueron madres O / RN A y 49,6 % fueron madres O / RN B. El 30,4 % de los casos (46/878) requirieron fototerapia y ninguno requirió exanguinotransfusión. Por otro lado, a pesar de lo expuesto, es importante saber que, la incompatibilidad ABO también puede llegar a producir casos graves, con alto grado de hiperbilirrubinemia que acaban por demandar tratamiento con exanguinotransfusión (11).

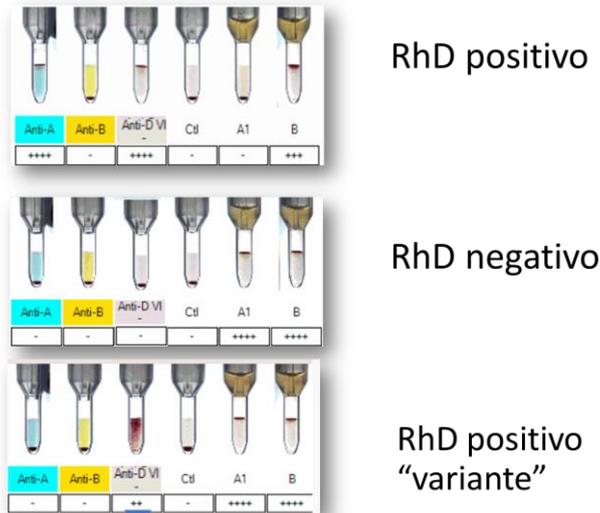
Es necesario un alto índice de sospecha para el diagnóstico precoz de la EHFRN por ABO. Esto es comprensible ya que la embarazada generalmente presenta un rastreo de anticuerpos irregulares (**RAI**) negativo y la Prueba Directa de Antiglobulina (**PAD**) del RN puede o no ser positiva. En estos casos, la evidencia de hemólisis determinada por el estudio de biomarcadores como bilirrubinas, hemoglobina y hematocrito, reticulocitos y enzimas hepáticas es la clave para sugerir la realización de un eluato que debe ser enfrentado con células A1 y B.

**La clasificación RhD** comprende la detección del antígeno D del sistema RH en los eritrocitos.

Identificar las madres RhD negativo o con fenotipo D variante, es importante para la definición del uso de la profilaxis anti-D y prevenir la EHFRN por RH. De acuerdo con las principales guías existentes, la muestra de una gestante debe ser tipificada con un anti-D monoclonal (IgM) que no reconozca las variantes DVI (antisuero Anti-DVI-). Además, no se recomienda la confirmación de antígeno D en la fase de Antiglobulina Humana (AGH), técnica denominada anteriormente como variante Du (12).

Para la ejecución de las pruebas de tipificación RhD se deben respetar las instrucciones del fabricante sobre el uso del reactivo control de Rh, ya que algunos antisueros anti-D utilizan potenciadores en su composición lo que podría conducir a la aglutinación espontánea de los glóbulos rojos en los casos de gestantes con PAD positiva. Cualquier resultado positivo en el tubo control, invalida el resultado con el anti-D utilizado. Un aspecto de relevancia es que el antisuero anti-D y el control de Rh deben ser de la misma marca y lote.

# LA IMUNOHEMATOLOGÍA EN LA RELACIÓN FETO MATERNA



**Imagen N°1** Imágenes representativas de la hemoclasificación ABO y tipificación RhD en muestras RhD positivo, RhD negativo y RhD variantes **Fuente:** Banco de imágenes de grupo Hemociencia

La interpretación de resultados en la tipificación RhD deben ceñirse a los grados de aglutinación estandarizados por el fabricante. En este sentido, un resultado RhD positivo se debe a una aglutinación de 4+; dependiendo de la técnica o reactivo utilizado las reacciones de 3+ o menos (técnica de gel centrifugación- Bio-Rad), o de 2+ o menos (técnica en tubo) se consideran como posibles RhD variantes.

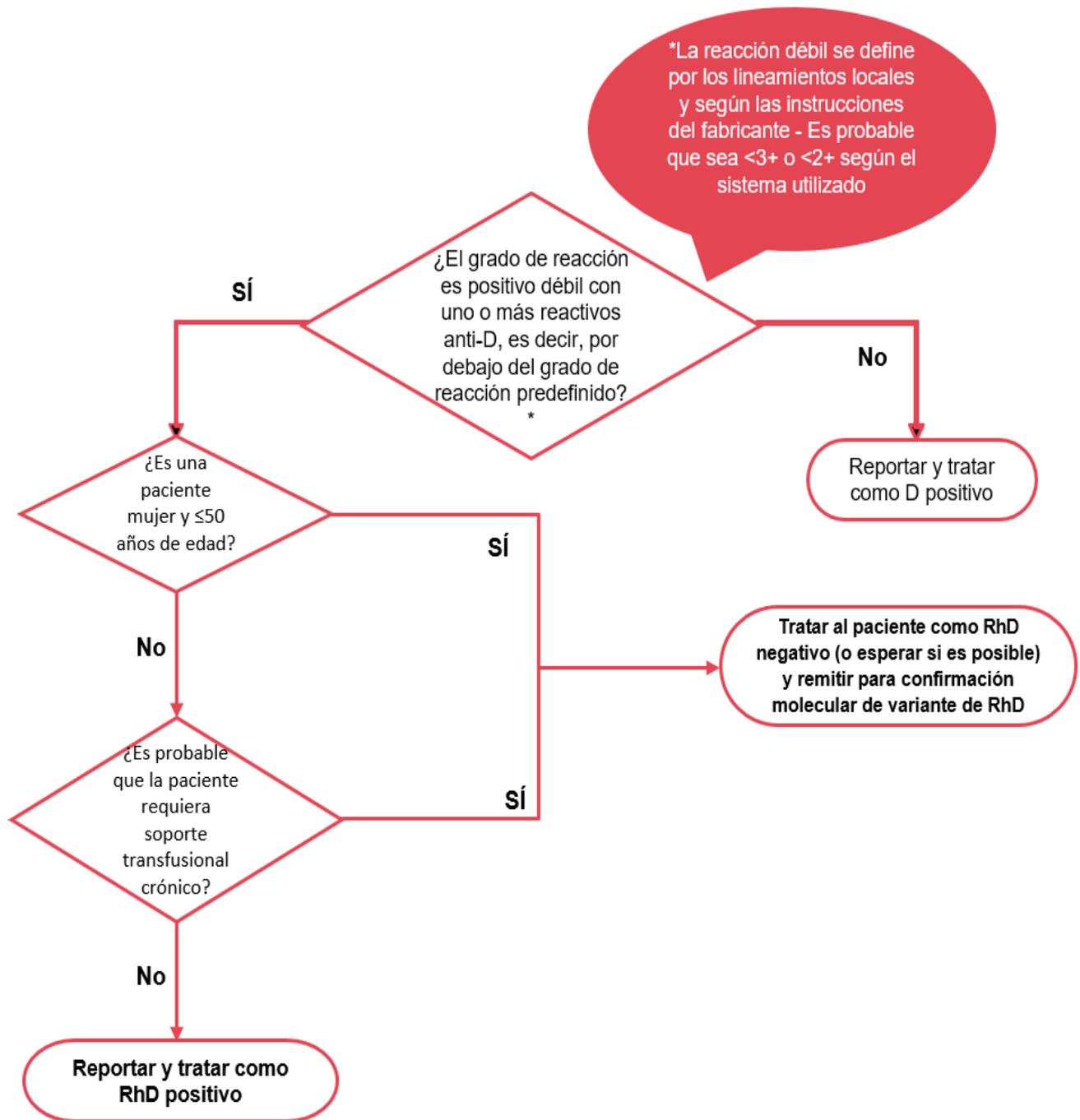
En los casos donde existan dudas sobre la interpretación de los resultados, sea por resultados débiles, o por resultados discrepantes entre dos o más Anti-D, la gestante debe ser tratada como si fuera RhD negativo. Esto se debe especialmente porque las técnicas basadas en serología no permiten diferenciar de manera inequívoca los fenotipos D parciales y D débiles, por ello se adopta una conducta conservadora a fin de evitar la sensibilización anti-D.

En la rutina de algunos países, las muestras maternas que presentan resultados débiles ( $\leq 2+$  para pruebas en tubo, o  $\leq 3+$  para las pruebas en gel) o discrepantes entre diferentes sueros anti-D son remitidas para la evaluación con técnicas de biología molecular. Este punto será desarrollado en la sección "*Aplicación de la biología molecular en la inmunohematología eritrocitaria feto-materna*".

Debido a que se ha reportado que una de las causas en la falla de la administración de la inmunoglobulina Anti-D es el error de la caracterización del tipo RhD en las muestras maternas, la realización de la prueba y la interpretación de resultados exige nuestro cuidado extremo y la aplicación de controles adecuados.

**Las gestantes RhD negativo que no poseen anti-D** deben recibir una primera dosis de la inmunoglobulina Anti-D en la semana 28 y hasta una segunda dosis dentro de las 72 horas después del parto en caso de resultar un recién nacido con RhD positivo, para evitar que se sensibilicen contra este antígeno. También está indicada la administración de inmunopprofilaxis anti-D si se han presentado eventos inmunizantes como abortos terapéuticos o espontáneos, accidentes o traumas que puedan producir hemorragia feto materna o ante la realización de exámenes invasivos tipo cordocentesis o amniocentesis.

# LA IMUNOHEMATOLOGÍA EN LA RELACIÓN FETO MATERNA



**Algoritmo N° 1** Algoritmo para la toma de decisiones en la tipificación RhD **Fuente:** Adaptado a partir del artículo científico de *Daniels G* (13).

### 3.2 Rastreo de anticuerpos irregulares (RAI):

El RAI es la prueba realizada para detectar la presencia de anticuerpos anti-eritrocitarios clínicamente significativos (IgG) capaces de cruzar la barrera placentaria. Se estima que el 1 % de las embarazadas cursan con anticuerpos clínicamente significativos (12).

La importancia de hacer el RAI (seguido de la identificación de anticuerpos irregulares cuando corresponde) al inicio del embarazo es poder detectar los casos de alto riesgo para el desarrollo de

## LA IMUNOHEMATOLOGÍA EN LA RELACIÓN FETO MATERNA

EHFRN, e iniciar oportunamente el seguimiento y tratamiento en las gestantes, que incluye la definición de la aplicación de la inmunoglobulina anti-D. Otro aspecto importante es detectar la presencia de anticuerpos que pueden causar problemas con el suministro de componentes sanguíneos para la gestante y para el feto/RN en casos de necesidad de transfusiones.

Actualmente, es bien conocido que el anti-D no es el único anticuerpo capaz de producir EHFRN, se reconoce que especificidades como anti-c y anti-K1 también desarrollan cuadros de EHFRN graves. Otras especificidades como anti-C, anti-E y anti-Fy(a) también han sido documentados en casos moderados. Por lo anterior, consensos internacionales sugieren la realización del RAI en todas las gestantes independiente de su ABO o RhD en el primer trimestre (semanas 8 a 12 semanas) (12) (14) (15).

El Comité Británico de Estándares en Hematología, sugiere repetir el RAI a todas las gestantes en la semana 28 de gestación. A su vez, la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea (SETS) orienta repetir el RAI en la semana 28, sólo para las gestantes RhD negativo o variantes de D (identificadas únicamente por técnicas serológicas), para orientar el uso de la profilaxis RH. Si el RAI sigue negativo, es pertinente la aplicación de la inmunoglobulina anti-D prenatal, si el RAI es positivo y el anticuerpo encontrado es un anti-D no es pertinente la aplicación de la inmunoglobulina anti-D prenatal (14).

Técnicamente, el RAI se realiza enfrentando el plasma materno con dos o tres reactivos de células de grupo O fenotipados para los principales antígenos de grupos sanguíneos de relevancia clínica. La prueba debe ser realizada por la técnica de antiglobulina indirecta (PAI) con incubación a 37°C según las recomendaciones de los insertos de los reactivos.

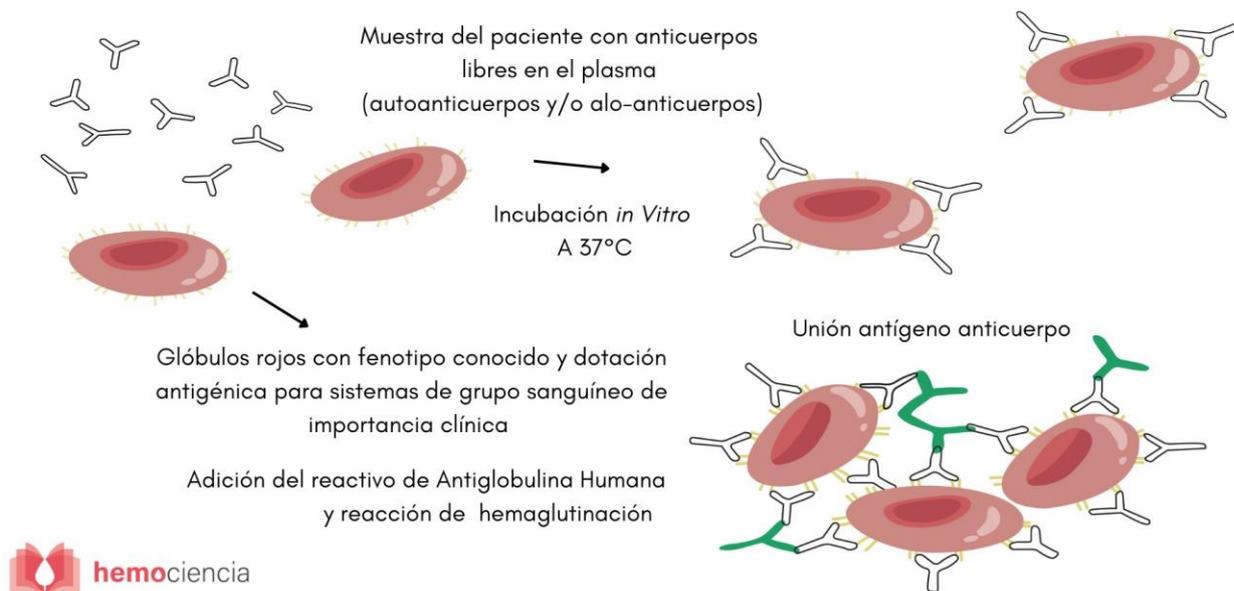
Según el protocolo de diagnóstico y prevención de la EHFRN de la SETS, en las células utilizadas para los estudios deben estar representados los siguientes antígenos: C, c, D, E, e, K, k, Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>, S, s, M, N y, Le<sup>a</sup>. Es recomendable que una célula de escrutinio sea R1R1 y otra R2R2 y que los antígenos Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>, S y s estén presentes en forma homocigota al menos en una de las células (14).

Dependiendo de la población estudiada, algunos antígenos de baja frecuencia pueden estar contemplados en los reactivos utilizados. Este es el caso del antígeno Di<sup>a</sup> en las poblaciones de Latinoamérica.

El uso de pool de células O RhD positivo, elaboradas "in house" sin estar fenotipados para los antígenos citados, expone a la gestante y al feto/RN a riesgos graves.

Cuando la PAI es realizada en la técnica convencional en tubo, exige el uso del reactivo control de AGH, su positividad al final de la reacción garantiza que los resultados negativos no son producto de fallas en la ejecución de la técnica. Para las técnicas en columna de gel, el uso del control de AGH no es necesario ya que no requieren fase de lavados o de adición de reactivos en etapas posteriores del proceso.

## Prueba Indirecta de Antiglobulina



**Imagen N°2** Esquema representativo de la Prueba Indirecta de Antiglobulina **Fuente:** Grupo Hemociencia

Sobre la interpretación y seguimiento a los resultados del RAI:

- **RAI negativo** significa que la gestante no presenta anticuerpos irregulares dirigidos contra los antígenos presentes en las células del reactivo.
- **RAI positivo** significa que la embarazada posee algún anticuerpo irregular dirigido contra los antígenos presentes en las células del reactivo. En este caso, es necesario determinar la especificidad de los anticuerpos mediante la prueba de Identificación de Anticuerpos Irregulares.

### 3.3 Identificación de anticuerpos irregulares:

El objetivo de la Identificación de Anticuerpos Irregulares (IAI) es determinar la especificidad y las características *in vitro* de los anticuerpos detectados en el RAI, lo que permite definir la importancia clínica y su posible asociación con EHFRN. Para la IAI se debe utilizar la misma técnica del RAI, enfrentando el plasma materno con un estuche más amplio de glóbulos rojos O fenotipados para los principales antígenos de importancia clínica; generalmente el estuche consta de 11 células reactivo, sin embargo, esto puede variar. La interpretación de esta prueba exige experticia del personal, especialmente cuando hay mezclas de anticuerpos.

Al identificar el anticuerpo, si este es considerado de importancia clínica, se sugiere derivar la gestante al especialista en medicina fetal para el seguimiento ecográfico oportuno con el fin de definir la presencia de hemólisis, anemia y sufrimiento fetal para dirigir intervenciones terapéuticas precisas y eficaces en torno a la prevención de EHFRN grave.

Los anticuerpos anti-D, anti-c y anti-K1 son comúnmente implicados en la EHFRN grave y justifican la intervención prenatal. Es de resaltar que aquellas gestantes con antecedentes de embarazos con

## LA IMUNOHEMATOLOGÍA EN LA RELACIÓN FETO MATERNA

EHFRN, deben ser consideradas de alto riesgo y por tanto derivadas al especialista de medicina fetal independientemente de la especificidad de los anticuerpos detectados.

Independiente de los regímenes de seguimiento prenatal, la recomendación del Comité Británico de Estándares en Hematología es realizar la IAI para verificar las especificidades de anticuerpos existentes en la madre e incluso definir las intervenciones en la selección de hemocomponentes antes de la transfusión fetal cuando es necesario.

A continuación, se describen las especificidades de anticuerpos anti eritrocitarios asociados a EHFRN:

Especificidades de aloanticuerpos con probabilidad de causar EHFRN.							
Anticuerpo	Sistema	Antígeno	Clase Ig	EHFRN	Gravedad EHFRN	Seguimiento ARO	Observación
Anti-D	Rh	D	IgG	Sí	Severa	Sí	
Anti-C		C	IgG	Sí	Leve	Sí	
Anti-c		c	IgG	Sí	Leve-severa	Sí	
Anti-E		E	IgG	Sí	Leve-moderada	Sí	
Anti-e		e	IgG	Sí	Leve	Sí	Usualmente raro
Anti-K	KELL	K	IgG	Sí	Leve-severa	Sí	
Anti-k		k	IgG	Sí	Leve-severa	Sí	Usualmente raro
Anti-Kpa		Kpa	IgG	Sí	Leve-severa	Sí	
Anti-Kpb		Kpb	IgG	Sí	Leve-moderada	Sí	
Anti-Jsa		Jsa	IgG	Sí	Leve-severa	Sí	
Anti-Jsb		Jsb	IgG	Sí	Leve-severa	Sí	
Anti-Fya	DUFFY	Fya	IgG	Sí	Leve-severa	Sí	EHFN severa: raro
Anti-Fyb		Fyb	IgG	Sí	Leve	Sí	Usualmente raro
Anti- Jka	KIDD	Jka	IgG	Sí	Leve- moderada	Sí	Usualmente raro
Anti-Jkb		Jkb	IgG	Raro	Ninguna-leve	Sí	
Anti-M	MNS	M	IgM/ IgG	Raro	Raro	IgG (Sí), IgM (No)	IgG: casos raros
Anti-N		N	IgM/IgG	Excepcional	Raro	IgG (Sí), IgM (No)	IgG: casos raros
Anti-S		S	IgG	Sí	Leve-severa	Sí	Usualmente raro
Anti-s		s	IgG	Sí	Leve-severa	Sí	Usualmente raro
Anti-Lea	LEWIS	Lea	IgM	No	Ninguna	No	
Anti- Leb		Leb	IgM	No	Ninguna	No	
Anti-Lua	LUTHERAN	Lua	IgM	No	Ninguna	No	
Anti-Lub		Lub	IgG	Sí	Leve	Sí	
Anti-P1	P	P1	IgM	No	Ninguna	No	
Anti-PP1PK		Pk	IgM/IgG	No/ Sí raro	Ninguna a severa	No	IgG muy raro
Anti-I	I	I	IgM	No	ninguna	No	
Anti-Di a	DIEGO	Di a	IgG	Sí	Leve a severa	Sí	
Anti-Di b		Di b	IgG	Sí	Leve	Sí	

Observación: por otras especificidades consultar literatura. Tomado de Marion E. Reid, Christine Lomas.Francis, Martin L. OlssonThe Blood Group Antigen. Facts Book. 2012. EHFN: enfermedad hemolítica feto neonatal; EHRN: enfermedad hemolítica del recién nacido; ARO: alto riesgo obstétrico.

**Tabla N°1** Especificidades de anticuerpos asociados a EHFRN **Fuente:** Adaptado a partir del artículo científico de Rivas y colaboradores (15)

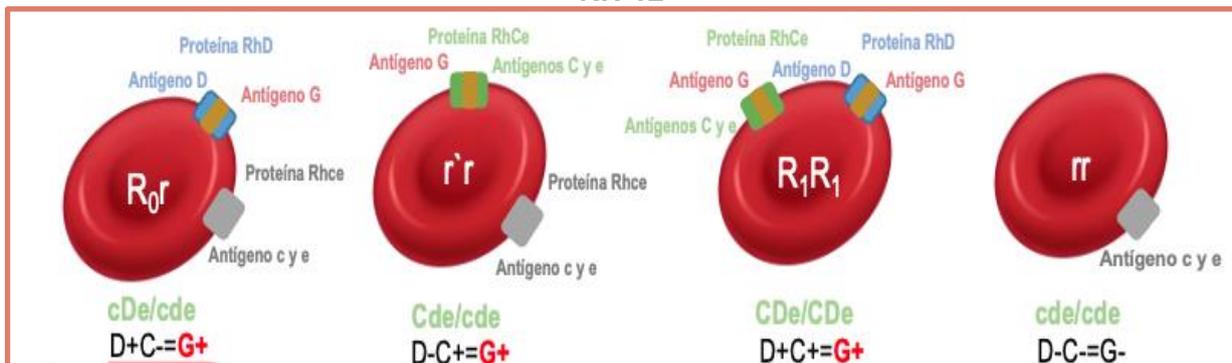
# LA IMUNOHEMATOLOGÍA EN LA RELACIÓN FETO MATERNA

- **Diferenciar Anti-D+C de anti-G optimiza el uso de la profilaxis anti-D**

Durante el proceso de identificación de anticuerpos en las gestantes, es posible encontrarnos con una mezcla de anticuerpos con especificidad anti-D+C, en estos casos se debe siempre sospechar la presencia de un posible anti-G

El antígeno G es uno de los 56 antígenos del sistema RH: RH12 (004012 o 4.12). Reportado por primera vez en 1958 cuando los glóbulos de un donante D-C-, reaccionan con anti-D+C. El antígeno G está presente en: 84 % de los caucásicos, el 92 % de los afrodescendientes, y el 100 % de los asiáticos. En su gran mayoría, las células que poseen el antígeno D y/o C expresan el antígeno G.

## Qué es el Antígeno G RH-12



**Imagen N°3** Diagrama de explicación del antígeno G **Fuente:** Grupo Hemociencia

El anti-G es un anticuerpo de la clase IgG detectable en la fase de AGH. Puede causar reacción transfusional tardía y EHFRR no tan severa. El anti-G reacciona con las células D+ y/o C+, células que expresan el antígeno G.

¿Qué tan importante es diferenciar anti-D+C de anti-G?

Una gestante RhD negativo que tiene un Anti-D+C no tiene indicación de administración de profilaxis anti-D (ya que se encuentra sensibilizada para el antígeno D). En contraste, una gestante RhD negativo que tiene un Anti-G (sin evidencia serológica de anti-D), debe recibir la profilaxis anti-D para prevenir la sensibilización por el antígeno.

El *Dr. Eduardo Muniz et al.* han definido un enfoque simple para la confirmación de la presencia de anti-D en sueros con una posible mezcla de anti-D+C en embarazadas utilizando un proceso de adsorción con células r'r. Las células r'r expresan los antígenos G y C, y no expresan el antígeno D. Si en la muestra problema hay un anticuerpo anti-D presente, el anticuerpo quedará libre en el plasma después de la adsorción, y podrá ser detectado en una PAI. Si identificamos un anticuerpo Anti-D en la muestra post adsorción se interpreta que la paciente está aloinmunizada y por lo tanto no tiene indicación de recibir la profilaxis anti-D. Si no identificamos un anticuerpo Anti-D en la muestra post adsorción se interpreta que la paciente no está aloinmunizada y tiene indicación de recibir la profilaxis anti-D (16).

### 3.4 Titulación de Anticuerpos Irregulares

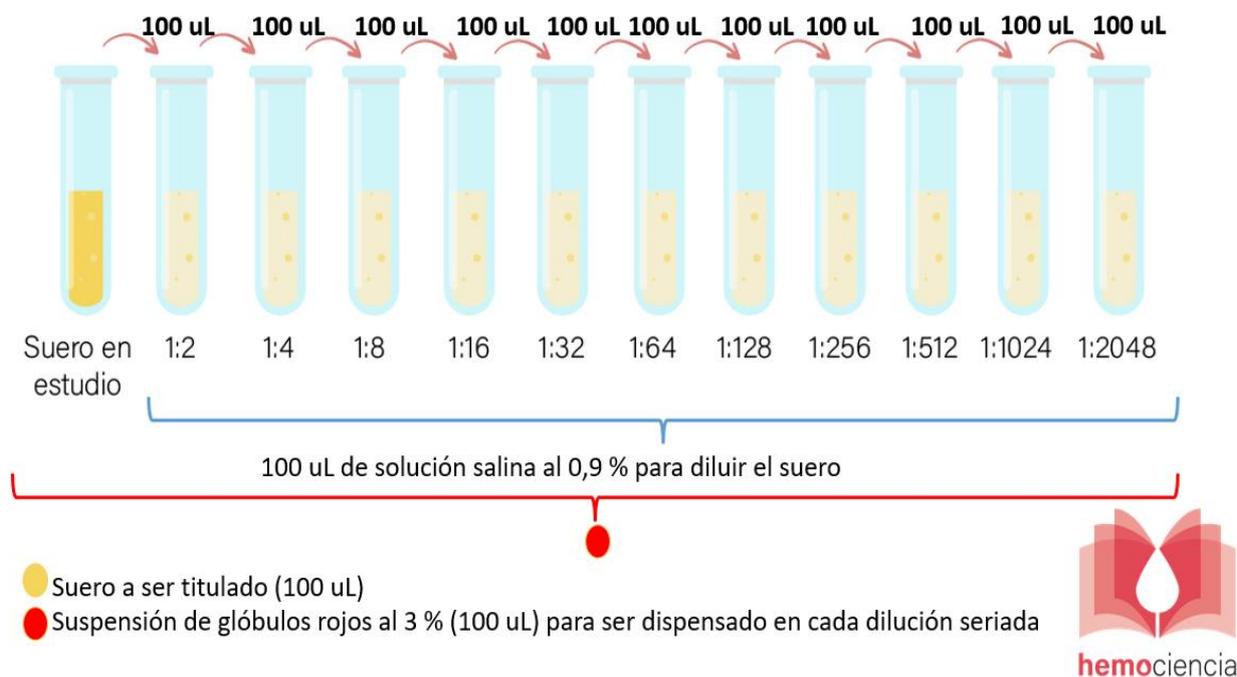
La titulación es un método semicuantitativo para determinar la concentración de un anticuerpo anti-eritrocitario. Por estar al alcance de la mayoría de los laboratorios, es la técnica más utilizada para

## LA IMUNOHEMATOLOGÍA EN LA RELACIÓN FETO MATERNA

monitorear los aloanticuerpos de potencial importancia clínica en las gestantes. Sin embargo, es un "procedimiento inherentemente impreciso" que exige rigurosidad en su realización y de controles muy específicos desde la preparación de las diluciones hasta la elección del fenotipo de los glóbulos rojos empleados para la titulación (9) (14) (17).

- **Preparación de las diluciones:**

La titulación utiliza diluciones seriadas en base 2 (12 tubos de titulación identificados como 1:2, 1:4, 1:8... hasta 1:2048). Para disminuir las variaciones analíticas algunos documentos técnicos establecen que las titulaciones son más precisas cuando se utilizan volúmenes más grandes al preparar las diluciones.



**Imagen N°4** Esquema representativo de la técnica de titulación de anticuerpos irregulares **Fuente:** Grupo Hemociencia.

Cuando la titulación se realiza en el contexto del seguimiento inmunohematológico de un embarazo, la primera muestra (realizada generalmente a partir de la 12ª semana de edad gestacional) establece la línea base de la titulación. Todas las titulaciones posteriores deben realizarse en paralelo con la muestra anterior; esta muestra debe ser conservada a  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  y al momento de ser utilizada se debe garantizar su completa descongelación y homogeneización. Para cumplir estos objetivos, el calentamiento previo a  $37^{\circ}\text{C}$  y un correcto pipeteo antes de su uso puede facilitar el acondicionamiento de la muestra histórica. Para preparar y dispensar cada dilución se debe cambiar la punta con la que se dispensó el volumen en el tubo correspondiente, esto evitará el efecto de arrastre entre diluciones y por lo tanto el incremento en el título de anticuerpo por un error técnico. Así mismo, todos los volúmenes estandarizados se deben dispensar con una pipeta volumétrica calibrada (9)(14)(17).

- **Selección del fenotipo de los glóbulos rojos para titulación**

Siempre que sea posible, se debe utilizar la misma fuente de antígenos en cada titulación. Esta recomendación se realiza ya que existe una gran heterogeneidad en la expresión de los antígenos incluso entre células del mismo fenotipo. Por ejemplo, las células R1R2 (DCcEe) pueden expresar

## LA IMUNOHEMATOLOGÍA EN LA RELACIÓN FETO MATERNA

entre 23.000 y 31.000 copias del antígeno D. Debido a que es imposible para la mayoría de los laboratorios tener para el seguimiento de titulación los mismos glóbulos rojos disponibles durante todo el embarazo, algunas guías técnicas recomiendan utilizar un pool de tres células (volumen por volumen) del mismo fenotipo (BioRad Laboratories- DiaMed GmbH, 2019). Con las células seleccionadas se debe preparar suspensiones según la técnica en que serán realizadas las pruebas. Durante todos los controles de titulación se debe utilizar siempre el mismo fenotipo de las células. Cambios en el fenotipo de las células puede impactar en el resultado de título y score.

Sobre el uso de células con expresión heterocigota u homocigota, no hay consenso. Hay lineamientos que recomiendan el uso de células con expresión heterocigota ya que reflejan de manera más real la situación *in vivo* del feto (quien será heterocigoto para el antígeno implicado en la incompatibilidad feto materna); por otro lado, hay lineamientos que recomiendan la selección de células homocigotas para incrementar la sensibilidad de la detección (9)(14). En este sentido cualquier método que elija el laboratorio debe ser validado, documentado y usado de manera sistemática. Respecto a la titulación del anti-D la mayoría de las guías recomiendan el uso de células R2R2 (DcE/DcE), este fenotipo es seleccionado ya que tiene la más alta expresión de antígeno D, comparado con otros fenotipos Rh o haplotipos Rh) (9)(14)(17).

- **Importancia de la identificación de anticuerpos en las pruebas de titulación**

No es útil realizar la titulación sólo por un resultado de RAI positivo sin identificar el anticuerpo, ya que la elección de los glóbulos rojos empleados en la titulación se realiza en función de la especificidad del o de los anticuerpos presentes en la muestra. Además, en presencia de mezcla de anticuerpos, si estos no son identificados de manera independiente se pueden obtener resultados de titulación erróneos.

Cuando en un estudio de una gestante se evidencia una mezcla de anticuerpos, se debe realizar una correcta identificación de cada una de las especificidades y la selección de los glóbulos rojos para la titulación debe hacerse asegurando que el título de cada anticuerpo es evaluado de forma independiente.

### **Ejemplo:**

Para titular una mezcla de anti-K+ anti-Fy(a), se deben hacer dos titulaciones independientes:

- **Fenotipo titulación 1:** K-; Fy(a+b+) permitirá titular el anti-Fy(a) sin interferencia en el título y score del anti-K
- **Fenotipo titulación 2:** K+k+; Fy(a-) permitirá titular el anti-K sin interferencia en el título y score del anti-Fy(a)

- **Interpretación de los resultados**

El título de anticuerpo es la inversa de la dilución más alta en la que se evidencia aglutinación de 1+.

### **Ejemplo:**

Si en un caso de titulación la última reacción de 1+ se presenta en la dilución 1:32, el título del anticuerpo será 32 (no se debe decir título 1:32)

Sin embargo, el título no siempre refleja la verdadera fuerza de un anticuerpo ni permite evidenciar cambios en su cinética. Utilizar un sistema de puntaje para los grados de aglutinación, puntaje

## LA IMUNOHEMATOLOGÍA EN LA RELACIÓN FETO MATERNA

denominado *score*, puede ayudar a tener una visión más completa del comportamiento del anticuerpo. Los métodos de *score* son diferentes, algunos usan *score* de 12 a 0 (lo más común), otros más sencillos de 5 a 0. Al igual que se discutió con el fenotipo de las células empleadas para la titulación, la institución debe validar y socializar con los profesionales de laboratorio y los clínicos que realizan uso de esta información el método de *score* que adoptará (9)(17).

A continuación, se describe el sistema de *score* de 12 puntos:

En este sistema a cada grado de aglutinación se le asigna un puntaje: 4+= 12 puntos; 3+= 10 puntos 2+= 8 puntos; 1+= 5 puntos; +/- o positiva débil= 2 puntos.

Para determinar el *score* se debe realizar la sumatoria de todos los puntajes obtenidos en la titulación; la sumatoria de este puntaje puede ir más allá del título ya que después de una reacción de 1+ puede haber una o más con reacciones +/-.

### Ejemplo: Títulos y score

		Dilución de la muestra										Título	Endpoint	Score
		Conc	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512			
Muestra 1	Fuerza	3+	3+	3+	2+	2+	2+	1+	+/-	+/-	-	64		
	Score	10	10	10	8	8	8	5	2	2	0		1:256	63
Muestra 2	Fuerza	4+	4+	4+	3+	3+	3+	2+	1+	+/-	-	128		
	Score	12	12	12	10	10	10	8	5	2	0		1:256	81
Muestra 3	Fuerza	1+	1+	1+	1+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	8		
	Score	5	5	5	5	2	2	2	2	2	0		1:256	30

**Tabla N°2** Ejemplos de titulación de anticuerpos irregulares **Fuente:** Procedimientos de titulación (17)

Según el manual técnico de la AABB una diferencia de dos diluciones o un *score* de 10 (diferencia entre el resultado de la muestra histórica y la muestra actual), es considerado como un cambio significativo en el comportamiento del anticuerpo. Otro valor que se tiene en cuenta es el **título crítico del anticuerpo**, un término que hace referencia al título a partir del cual incrementa el riesgo de EHFRN y por lo cual es necesario complementar el seguimiento de las gestantes con imágenes diagnósticas o procedimiento invasivos (Eco Doppler, ultrasonido, amniocentesis o cordocentesis) para establecer si los hallazgos de laboratorio se correlacionan con hallazgos clínicos y de ser así para estimar la severidad de la enfermedad. Es importante resaltar en este punto que solo se realiza titulación y seguimiento de titulación a anticuerpos clínicamente significativos y que sean de tipo IgG; en este contexto anticuerpos benignos como los anti-Lea, anti-Leb, anti-P1, anti-N, anti-I no requieren seguimiento inmunohematológico (a excepción de que se identifiquen hallazgos clínicos que ameriten su realización) (9).

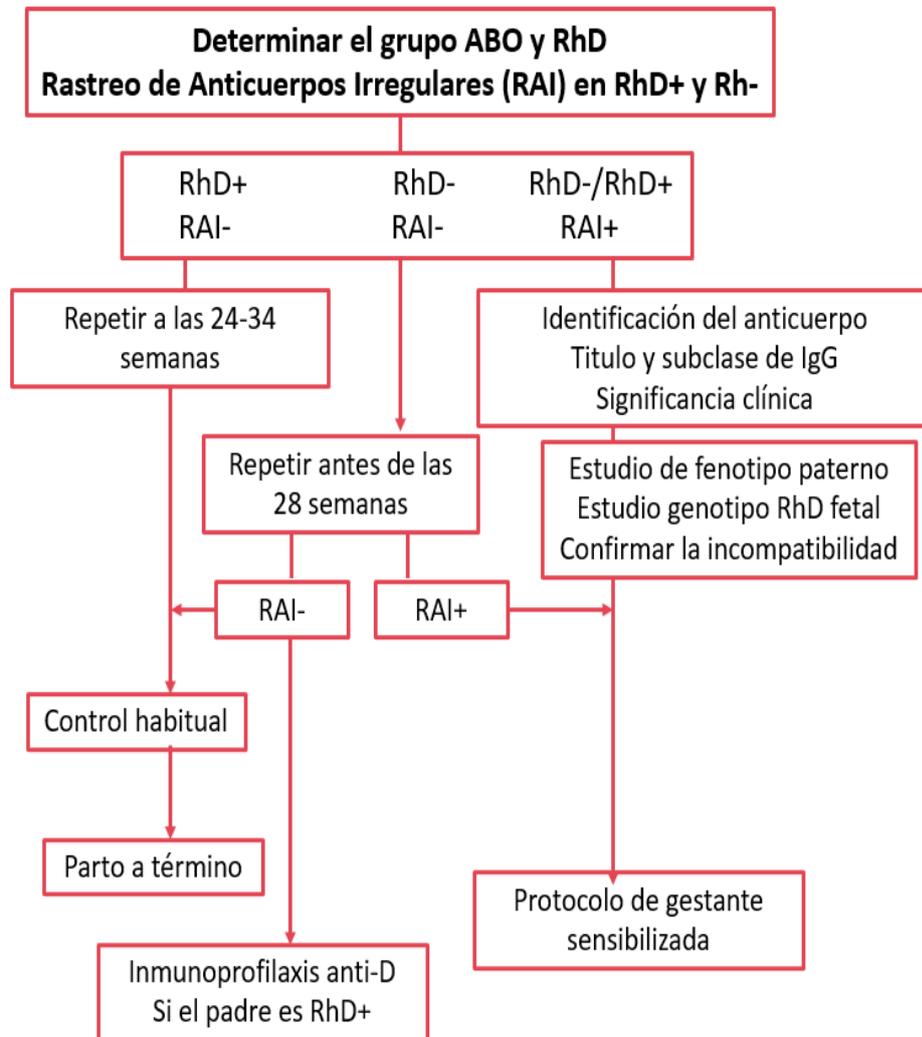
- **Título crítico de anticuerpos:**

- **Anti-D, otras especificidades Rh:** en la mayoría de los estándares se considera un título crítico mayor a 32. Por debajo de este valor el riesgo de EHFRN o de hidropesía fetal es muy bajo. Si en los estudios de titulación el título es 8 o menor se recomienda realizar seguimiento de la gestación con titulaciones cada 4 a 6 semanas hasta el parto.
- **Anti-K:** Según algunas guías los estudios complementarios deben ser realizados una vez se identifica esta especificidad. En contraste, el manual técnico de la AABB estima 8 como título crítico para este anticuerpo. Esta conducta es utilizada ya que la EHFRN por anti-K,

## LA IMUNOHEMATOLOGÍA EN LA RELACIÓN FETO MATERNA

en la mayoría de los casos, cursa con cuadros clínicos severos en los que se encuentra presente la inhibición de la eritropoyesis y la hidropesía fetal.

- **Otros anticuerpos:** No se han establecido títulos críticos para otras especificidades. Sin embargo, para anticuerpos de importancia clínica de acuerdo con los estándares de la AABB se sugieren las mismas consideraciones que para anti-D.



**Algoritmo N°2** Algoritmo de seguimiento inmunohematológico en gestantes **Fuente:** Sección IV libro de Inmunohematología Básica y Aplicada GCIATM (18)

### 4. Seguimiento Inmunohematológico y Diagnóstico con relación al Recién Nacido:

En el contexto latinoamericano, es importante realizar reflexiones sobre la pertinencia técnica de seguimiento inmunohematológico del RN en el periodo postnatal entendiendo que el alta hospitalaria temprana de los RN se ha convertido en una práctica común por razones administrativas, sociales y económicas. Al respecto, la recomendación de la Academia Americana de Pediatría (APP) (19) con el objetivo de prevenir los cuadros de hiperbilirrubinemia grave y kernicterus, es realizar el seguimiento en las primeras 48 horas de los RN con factores de riesgo asociados para hiperbilirrubinemia grave y los cuales son:

## LA IMUNOHEMATOLOGÍA EN LA RELACIÓN FETO MATERNA

- RN con nivel de bilirrubina sérica comparable con zona de alto riesgo
- Ictericia en las primeras 24 a 30 horas
- Incompatibilidad sanguínea entre la madre y el RN con PAD positiva
- Hermanos con antecedentes de ictericia o EHFRN y/o requerimiento de fototerapia
- Cefalohematomas o hematomas significativos
- Diversidades étnicas
- Multiparidad.

La identificación de ictericia grave es fundamental para prevenir la readmisión hospitalaria tardía y las complicaciones derivadas de la EHFRN.

### 4.1 Análisis inmunohematológicos en muestras de cordón umbilical:

Durante el año 1968 *Clifford et al* (20); realizaron un estudio para determinar la frecuencia de IE en muestras de cordón umbilical (CU) de 7340 RN, evidenciando que esta ocurría en 0,9% por incompatibilidad RhD y 1,5% por incompatibilidad ABO. En la actualidad, autores latinoamericanos han investigado la frecuencia de IE mediante PAD en muestras de CU evidenciando que ocurre del 3,6% al 6,5% (21)(22)(23). Según *Barreto y Cols*, estrategias como la correcta toma de muestras por punción del CU, el lavado de glóbulos rojos con solución salina y la implementación de controles salinos en la prueba directa de hemoclasificación, permiten validar resultados satisfactorios (24).

La muestra de CU tiene múltiples ventajas para la realización de pruebas de inmunohematología entre ellas se destaca la calidad biológica de la muestra al contener una gran concentración de anticuerpos maternos y eritrocitos fetales ideales para pruebas inmunohematológicas; por otra parte, el buen volumen disponible para estudios complementarios asociados a hemólisis inmunológica como hemoglobina, hematocrito, reticulocitos, bilirrubinas y marcadores hepáticos, lo cual evita punciones innecesarias al RN y la anemia iatrogénica. Cuando el CU se emplea solo para análisis hematológicos o inmunohematológicos es pertinente el empleo de tubos con EDTA o heparina de litio; en caso de análisis de química sanguínea es pertinente el empleo de tubos con heparina de litio o tubos sin anticoagulante; de cualquier modo, es importante emplear los tubos sugeridos por el fabricante de la plataforma tecnológica implementada en el laboratorio para los exámenes de interés clínico.

- **Recomendaciones sobre la realización de la hemoclasificación en el RN:**

En el RN es pertinente la realización solo de la prueba directa de la hemoclasificación utilizando sueros monoclonales anti-A, anti-B y anti-AB con el fin de detectar los antígenos del sistema ABO. Los resultados deben ser bien interpretados considerando que los glóbulos rojos del RN tienen 1/3 de sus antígenos ABO presentes respecto a los glóbulos rojos de los adultos y es posible que las reacciones de hemaglutinación sean débiles o excepcionalmente ausentes. Por otra parte, no está indicada la realización de la prueba inversa de la hemoclasificación en la muestra del RN debido a la inmadurez inmunológica para la producción de anti-A y anti-B antes de los 4 meses de vida. Sin embargo, ante la fuerte sospecha clínica de incompatibilidad ABO se sugiere la evaluación del plasma o suero del RN en fase de antiglobulina indirecta para la detección de anti-A o anti-B adquirido de la madre (25).

## LA IMUNOHEMATOLOGÍA EN LA RELACIÓN FETO MATERNA

- **Recomendaciones sobre la realización de la Prueba de Antiglobulina Directa (PAD):**

La PAD en el RN consiste en la identificación de IgG fijadas en la membrana de los glóbulos rojos por medio del reactivo de AGH. Los principales consensos internacionales han indicado la realización de la PAD en los RN con factores de riesgos asociados a EHFRN (19). Considerando que no todos los casos de IE y EHFRN cursan con PAD positiva, e incluso puede haber PAD negativa en RN con ictericia significativa, algunas veces son necesarias pruebas más sensibles como la elución para investigar la presencia de anticuerpos fijados a los glóbulos rojos del RN e identificarlos mediante PAI (26) (27). Recientemente, autores han documentado que las razones por las cuales la PAD puede ser negativa en esta entidad comprenden la baja concentración de anticuerpos disponibles en la circulación de RN, la severidad de la hemólisis y la subclase de inmunoglobulina asociada (28). Así mismo, un resultado de PAD positivo no debe ser interpretado como hemólisis inmunológica pues es necesario la determinación de biomarcadores específicos en sangre (bilirrubinas, hemoglobina, hematocrito, reticulocitos, etc.) y los signos clínicos característicos en el paciente para confirmar la presencia de EHFRN (19)(26)(29).

- **Validez diagnóstica de la elución en la investigación inmunohematológica en el RN:**

Recientemente, *Toro Espinosa et al.* publicaron un estudio en el cual investigaron la frecuencia de IE en 306 RN del oriente antioqueño, (Colombia) empleando muestras de CU para análisis de hemoclasificación directa, PAD y PAI posterior a elución ácida. Los resultados de PAD positivo evidenciaron que la frecuencia de IE fue 6,2 % (19/306). Interesantemente, al realizar procesos de elución se logró determinar que la frecuencia fue 14,1 % (43/306) y la diferencia entre ambas frecuencias fue estadísticamente significativa ( $V_p \text{ Chi}^2 = 0,002$ ) (23).

Al aplicar y comparar métodos estadísticos de validez diagnóstica, concluyeron que la PAI posterior a elución ácida es válida y clasifica correctamente los casos positivos de IE debido a la alta sensibilidad de la prueba y el buen índice de validez (sensibilidad 98,8 % (IC 95 %: 86,33 -107,26) y especificidad de 92,31 % (IC 95 %: 88,84 - 95,52)). A su vez, la seguridad del método permitió evidenciar que la probabilidad de hallar un resultado negativo en neonatos sanos es alta y la *eficiencia diagnóstica* demuestra que el método es suficiente para la detección de la IE en muestras de CU en las primeras horas de vida. En este estudio, se detectaron 25 discrepancias entre los métodos de evaluación, 17 casos fueron por anticuerpos ABO y 8 casos por anticuerpos irregulares subestimados por el método de PAD considerado un "Gold Imperfecto" y detectados por elución ácida; lo cual pone de manifiesto la capacidad de este método para concentrar anticuerpos IgG en eluados e incrementar la sensibilidad en la detección en la fase antiglobulina.

### 5. Consideraciones Inmunohematológicas para la Transfusión en Recién Nacidos:

Algunas sociedades científicas como AABB y SETS establecen dentro de los lineamientos técnicos efectuar estudios pre-transfusionales inmunohematológicos en menores de 4 meses; el abordaje inicial de los pacientes debe incluir la hemoclasificación ABO y RhD en los glóbulos rojos del RN y la investigación de anticuerpos irregulares anti-eritrocitarios utilizando suero o plasma de la madre preferiblemente o del propio RN.

Durante la hospitalización puede omitirse la prueba de compatibilidad cruzada y no repetirse la hemoclasificación directa e investigación de anticuerpos si se cumplen los siguientes criterios: el *RAI es negativo y se desean transfundir unidades del grupo O*; en caso de transfundir unidades ABO idénticas o ABO compatibles, es necesario evaluar el plasma del RN para identificar anti-A y anti-B

## LA IMUNOHEMATOLOGÍA EN LA RELACIÓN FETO MATERNA

adquirido de la madre que permita seleccionar las unidades correctas. Respecto al antígeno D puede ser idéntico al del paciente (25)(30).

En caso de RAI positivo en la muestra del RN o de la madre, el RN debe recibir unidades que carezcan de los antígenos respectivos y realizar las pruebas cruzadas mediante PAI. En este escenario, los análisis deben repetirse en cada transfusión hasta que el anticuerpo materno no se detecte en la muestra del RN. Después de la obtención de resultados negativos para anticuerpos irregulares, no se requieren pruebas cruzadas ni transfusión de unidades antígeno negativo hasta los 4 meses de edad. La política del servicio de transfusión determinará la frecuencia para un nuevo estudio del paciente sobre la presencia de anticuerpos.

Respecto a las transfusiones de plaquetas y plasma deben ser siempre ABO y RhD idénticas o compatibles con el receptor. Se recomienda administrar unidades de plaquetas obtenidas por aféresis para reducir la exposición a diferentes donantes (30).

Por último, es importante resaltar que los servicios de sangre deben evitar la transfusión de componentes sanguíneos que puedan transferir pasivamente al RN anticuerpos irregulares o anticuerpos anti-A o anti-B incompatibles; en caso de no realizar los análisis pertinentes a los donantes de sangre para evitar esta situación, será necesario crear políticas institucionales y protocolos más completos en torno a la transfusión segura en RN.

### 6. Aplicación de la Biología Molecular en la Inmunohematología Eritrocitaria feto materna

Como describimos en secciones previas, para realizar el diagnóstico de la aloinmunización durante el primer trimestre del embarazo se debe realizar a la gestante el grupo ABO, tipificación del antígeno D y detección de anticuerpos irregulares. Si el RAI es positivo, se debe determinar la especificidad y la importancia clínica del anticuerpo. Cuando se identifican anticuerpos de importancia clínica, siempre que sea posible, es útil evaluar en una muestra de sangre paterna el fenotipo del antígeno implicado; esta evaluación proporciona información para predecir el riesgo del feto o RN de sufrir EHFRN (9)(14).

Considerando lo anterior y dependiendo del genotipo / fenotipo paterno hay dos escenarios:

- El feto de un padre homocigoto tendrá el 100 % de probabilidad de heredar el alelo responsable de la incompatibilidad y por ende expresar el antígeno específico.

Padre	Madre	
	d	d
D	Dd	Dd
D	Dd	Dd
<b>Hijo</b>		
	100% de probabilidad de que el feto o el recién nacido sea portador del antígeno (Dd)	

**Tabla N°3** Adaptación del cuadro de Punnet para ilustrar los genotipos probables del hijo de una gestante RhD negativa y un padre RhD positivo homocigoto **Fuente:** Grupo Hemociencia

## LA IMUNOHEMATOLOGÍA EN LA RELACIÓN FETO MATERNA

- El feto de un padre hemicigoto (término que hace referencia al individuo que posee solo una copia funcional del gen *RHD* o de otro sistema) o heterocigoto, tendrá un 50 % probabilidad de heredar el alelo responsable de la incompatibilidad y por lo tanto de expresar el antígeno específico

<b>Padre</b> 	<b>Madre</b> 	
	<b>d</b>	<b>d</b>
<b>D</b>	<b>Dd</b>	<b>Dd</b>
<b>d</b>	<b>dd</b>	<b>dd</b>
<b>Hijo</b>		
 50% de probabilidad de que el feto o el recién nacido sea portador del antígeno (Dd)	 50% de probabilidad de que el feto o el recién nacido no sea portador del antígeno (dd)	

**Tabla N°4** Adaptación del cuadro de Punnet para ilustrar los genotipos probables del hijo de una gestante RhD negativa y un padre RhD positivo hemicigoto **Fuente:** Grupo Hemociencia

En este punto es donde la biología molecular puede ser complementaria para el diagnóstico de la incompatibilidad feto materna y constituye un apoyo en las estrategias de seguimiento clínico y de administración de la inmunoprofilaxis anti-D teniendo en cuenta las siguientes consideraciones (9)(14):

- Para la evaluación del riesgo de la EHFRN por Anti-D, si la madre es RhD negativa y el padre RhD positivo, una prueba de fenotipo no es suficiente para determinar la cigosidad del antígeno D paterno. Por lo cual está indicado realizar genotipo *RHD* paterno o fetal.
- En el escenario de un padre heterocigoto o hemicigoto, es útil evaluar el genotipo fetal para establecer si existe incompatibilidad feto materna ya que hay un 50 % de probabilidad de que el feto no haya heredado el antígeno del cual se sospecha incompatibilidad y por lo tanto no sean necesarias estrategias de seguimiento inmunohematológico durante el embarazo ni se requiera la administración de inmunoprofilaxis anti-D.
- Ya que no siempre hay a disposición una muestra para realizar la prueba de fenotipo o genotipo paterno, se puede emplear la determinación de grupo sanguíneo fetal para evaluar de manera precisa el grupo sanguíneo y concluir la existencia o no de incompatibilidad feto materna.

### 6.1 Evaluación de la cigosidad *RHD* paterna

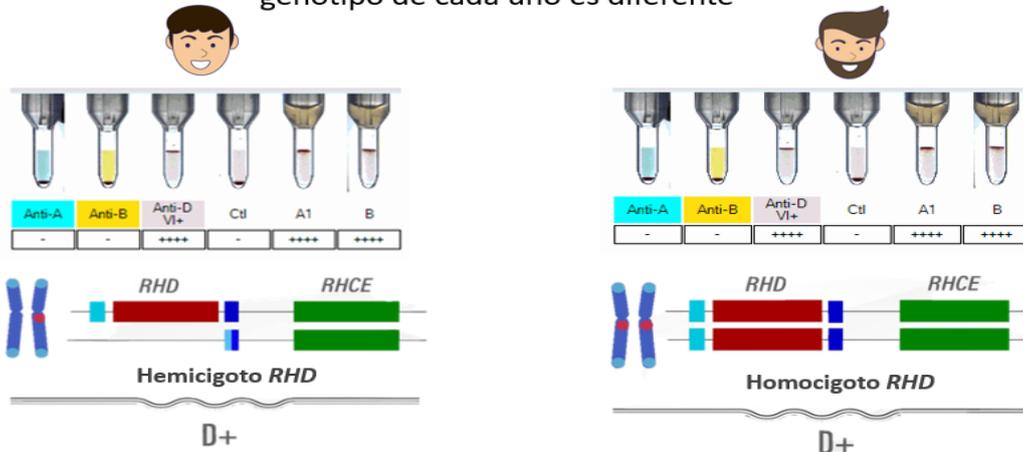
Las técnicas basadas en serología permiten evaluar de manera cualitativa la presencia o ausencia del antígeno D, lo cual es útil en la mayoría de los escenarios clínicos. Sin embargo, no permiten identificar la cigosidad *RHD* de un individuo. En el estudio de la EHFRN la información de la cigosidad paterna *RHD* es relevante ya que está estrechamente relacionada con el riesgo de que el feto herede el antígeno eritrocitario responsable de la incompatibilidad feto materna y además brinda información para que se instaure el seguimiento clínico a la gestación y se implementen las medidas terapéuticas para mitigar el riesgo de aloinmunización anti-D.

## LA IMUNOHEMATOLOGÍA EN LA RELACIÓN FETO MATERNA

Lo anterior, ya que el fenotipo RhD positivo puede deberse a la presencia de dos copias funcionales del gen *RHD* (individuos homocigotos, D/D) o de una sola copia funcional (individuos hemicigotos, D/d).

### ¿Estos dos individuos son iguales en la tipificación RhD?

Por técnicas serológicas sí pero el genotipo de cada uno es diferente



**Imagen N°5:** Hallazgos serológicos y moleculares en individuos homocigotos y hemicigotos para el gen *RHD* Fuente: Grupo HemoCiencia

Una aproximación serológica para evaluar la cigosidad se basa en la determinación completa del fenotipo Rh (D, C/c, E/e) en individuos RhD positivo, y que parte del hecho de que estos antígenos se heredan de una manera estrechamente relacionada. A partir de las frecuencias con las que se produce el complejo de haplotipos Rh en diferentes poblaciones se puede predecir el genotipo más probable (esta predicción puede constituir un reto especialmente en poblaciones mestizas o en poblaciones en la que no se cuente con los reportes de haplotipos Rh) (9).

A continuación, se presentan algunos ejemplos para profundizar la idea:

- Un individuo con fenotipo D+C+c+E-e+ de etnia caucásica tiene el 31.1 % de probabilidad de ser genotipo D<sup>C</sup>e/Ce (R<sup>1</sup>r') (genotipo hemicigoto para *RHD*); mientras que la probabilidad es del 8.8 % en un individuo afrodescendiente. En contraste, un individuo afrodescendiente con este fenotipo tiene el 15.0 % de probabilidad de ser R<sup>1</sup>R<sup>0</sup> (genotipo homocigoto para *RHD*).
- Un individuo con fenotipo D+C-c+E-e+ de etnia caucásica tiene el 3.0 % de ser genotipo Dce/ce (R<sup>0</sup>r) (genotipo hemicigoto para *RHD*); mientras que la probabilidad es del 22.9 % en un individuo afrodescendiente.

## LA IMUNOHEMATOLOGÍA EN LA RELACIÓN FETO MATERNA

- Un individuo caucásico con fenotipo D+C+c-E-e+ tiene un 17.6 % de probabilidad de ser genotipo DCe/DCe mientras que un individuo afrodescendiente tiene un 22.9 % de tener el mismo genotipo.

En este contexto, sólo las técnicas moleculares permiten definir certeramente la cigosidad del gen. Para ello se han estandarizado estrategias que cuantifican la dosis del gen *RHD* con PCR en tiempo real (32) o diferentes tipos de PCR que permiten la caracterización molecular de los diferentes genotipos RhD en función de los patrones de migración que producen en un gel de agarosa los fenotipo RhD negativos, los fenotipos RhD positivos hemicigotos y los RhD positivos homocigotos (33).

### 6.2 Genotipo empleando ADN libre fetal

El descubrimiento del ADN libre fetal en plasma materno se realizó en 1997 y constituye uno de los principales avances en el diagnóstico fetal no invasivo de aneuploidías, en la determinación de sexo fetal y en la detección temprana de la incompatibilidad feto manera. Previo a la implementación de esta técnica, para la toma de muestras era necesaria la realización de amniocentesis o biopsia de vellosidades coriónicas, procedimientos que incrementan el riesgo de hemorragia feto materna y la sensibilización o re-estimulación contra el antígeno responsable de la incompatibilidad.

En el contexto de la inmunohematología, el fundamento de determinar el genotipo del grupo sanguíneo fetal se basa en la detección de alelos heredados del padre no presentes en el genoma de la madre (ejemplo gestante RhD negativa con un feto que puede heredar el antígeno D paterno). Esto es posible ya que las células placentarias apoptóticas y necróticas (trofoblastos placentarios) liberan en la circulación materna el ADN fetal, un grupo de pequeños fragmentos de ADN de aproximadamente <150 pb de longitud que se encuentran presentes desde la cuarta semana de gestación y cuyas concentraciones incrementan durante el embarazo (3 % durante el primer trimestre de gestación con un incremento del 6 % en el tercer trimestre). Además de ser un procedimiento no invasivo, el ADN fetal puede aislarse fácilmente, es resistente a la temperatura ambiente y se considera un marcador específico fetal debido a su corta vida media post parto (34).

La determinación de ADN fetal generalmente ha sido utilizada para la evaluación *RHD* del feto. Los métodos empleados se basan en la técnica de PCR en tiempo real, una técnica sensible y específica en la cual se detectan pocas copias de ADN fetal y en la que se amplifican dos o más exones del gen (principalmente los exones *RHD* 4 a 7). Sin embargo, debido a que el gen *RHD* es altamente polimórfico, que la genética difiere entre grupos poblacionales y las prevalencias son muy diferentes entre ellos, es necesario que cada laboratorio diseñe o complemente su ensayo en función de las características genéticas de su población (35).

Los resultados de los estudios disponibles sobre *RHD* fetal documentan una alta sensibilidad, del 99 % a las 10 a 11 semanas de edad gestacional y del 99,9 % a las 25 semanas de edad gestacional. En estos ensayos se han utilizado diferentes estrategias con el fin de validar la presencia de ADN fetal, dentro de ellos se encuentran marcadores como el gen *SYR* (del inglés *Sex determining Región Y*), gen asociado a la determinación de sexo masculino, y cuya detección en el ADN extraído del plasma de una gestante confirma la presencia de material genético fetal en suficiente concentración para garantizar un resultado confiable de grupo sanguíneo fetal; otras estrategias para validar la presencias de ADN fetal son el uso de marcadores epigenéticos o la evaluación de resultados en dos muestras independientes (36).

## LA IMUNOHEMATOLOGÍA EN LA RELACIÓN FETO MATERNA

El estudio del ADN libre fetal ha sido implementado en diferentes países del mundo como Suecia en 2009, Dinamarca en el 2010, en los Países Bajos en 2011, en Inglaterra en 2013, en 2014 en Finlandia, así como en Francia y Bélgica, otros países europeos y de Norte América como una estrategia para (35)(37):

- **Evaluar el riesgo de EHFRN en gestantes aloimmunizadas:** en el caso de una gestante RhD negativa con aloimmunización anti-D, se realizará seguimiento y tratamiento más estricto para mitigar el impacto clínico de la EHFRN; mientras que, si el feto es RhD negativo, se pueden eliminar pruebas excesivas e innecesarias que incrementan las intervenciones en las gestantes y los costos de atención en salud.
- **Genotipificación de RhD fetal para guiar la profilaxis Rh prenatal:** la profilaxis prenatal se administra en gestantes RhD negativas sin aloimmunización anti-D como una dosis única de 250-300 ug de inmunoglobulina Rh en la semana gestacional 28 o 29; la profilaxis postnatal se administra dentro de las 72 horas posteriores al parto. Este esquema usualmente es utilizado en todas las gestantes RhD negativo ya que el grupo sanguíneo fetal es desconocido hasta el nacimiento. En este punto, el genotipo fetal RhD no invasivo permite que la inmunoprofilaxis anti-D prenatal se administre sólo a gestantes con fetos RhD positivo. Esta utilidad evita la exposición innecesaria de la gestante a un medicamento de origen humano y que en algunos países no cuenta con suficiente disponibilidad.

Para ilustrar el impacto de esta estrategia, se pueden tener en cuenta los reportes de población caucásica europea donde aproximadamente el 40 % de las mujeres embarazadas gestan fetos RhD negativo y que por lo tanto no tienen riesgo de aloimmunización y no requieren tratamiento, situación que contribuye a la disminución de costos de atención en salud y al uso racional de la inmunoprofilaxis anti-D.

### 6.3 Utilidad de la genotipificación en el estudio de variantes RhD en gestantes

En la sección de tipificación RhD identificamos que las técnicas serológicas no nos permiten diferenciar entre los fenotipos D débiles y D parciales. Sin embargo, realizarlo tiene utilidad en la administración de inmunoprofilaxis RhD y la selección de componentes sanguíneos.

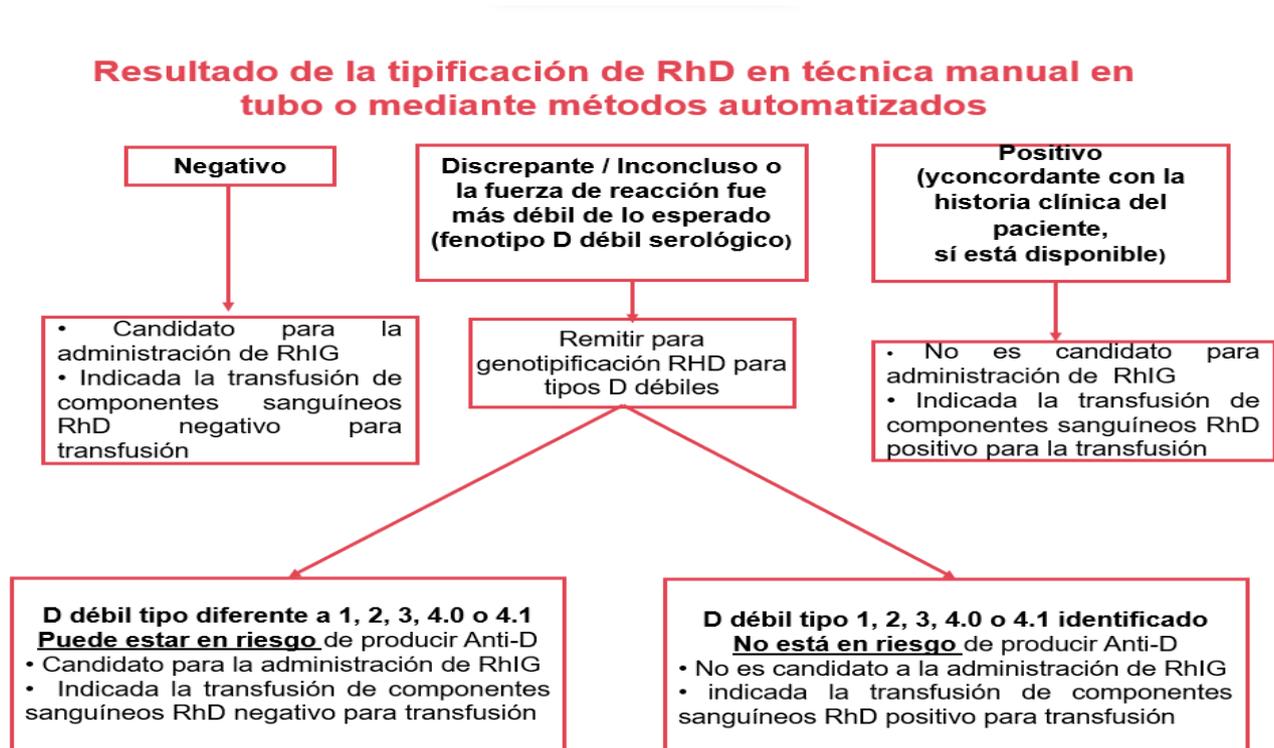
De acuerdo con lo reportado en la literatura, los individuos con fenotipo D variante tipificados molecularmente como portadores de alelos D débil tipo 1, D débil tipo 2, D débil tipo 3 (38), D débil tipo 4.0 y D débil tipo 4.1 en estado homocigoto o hemicigoto no tienen riesgo de aloimmunización anti-D cuando se exponen a glóbulos rojos RhD positivo (39)(40)(41). En estos casos no está indicada la administración de inmunoprofilaxis RhD ni la administración de componentes sanguíneos RhD negativos. Este protocolo contribuye al uso racional de la profilaxis RhD y de los componentes sanguíneos, especialmente ya que la prevalencia de estos fenotipos en caucásicos europeos puede ser hasta del 95 %.

Por otro lado, se ha reportado aloimmunización en otros tipos de D débiles como los D débiles tipo 4.2, tipo 11, tipo 15, tipo 21 y tipo 57 por lo cual en estos casos se adopta una estrategia conservadora para prevenir la aloimmunización anti-D con la administración de inmunoprofilaxis RhD y la transfusión de componentes RhD negativo para estos fenotipos. Este mismo lineamiento se utiliza para otros tipos de RhD variantes en los cuales no hay suficiente evidencia que permita concluir si están o no en riesgo de aloimmunización (38).

## LA IMUNOHEMATOLOGÍA EN LA RELACIÓN FETO MATERNA

En razón a estas consideraciones, el Colegio Americano de Patólogos recomienda que se realice genotipo *RHD* cuando se identifican resultados de tipificación de RhD discrepantes y/o cuando se identifica un hallazgo sugestivo de una variante de D en una mujer en edad fértil. En una estimación realizada por este grupo de expertos se concluyó que incorporar el genotipo *RHD* en Estados Unidos podría prevenir la administración de 24,700 inyecciones innecesarias de inmunoprofilaxis anti-D; así mismo, evitaría la transfusión innecesaria de 47.700 unidades de glóbulos rojos que podrían ser utilizadas en pacientes que tienen la indicación de transfusión de componentes RhD negativos(38).

En este escenario el abordaje para la tipificación RhD se describe en el siguiente algoritmo:



**Algoritmo N° 3** Algoritmo para la toma de decisiones en la tipificación RhD utilizando herramientas de biología molecular **Fuente:** Adaptado a partir del artículo científico de *Sandler et al.* (38).

### 7. Inmunohematología Plaquetaria

En los apartados anteriores se ha discutido lo relacionado con las interacciones que se presentan con los glóbulos rojos en la relación feto materna. Sin embargo, tenemos otro protagonista que no podemos dejar de mencionar y revisar detenidamente, las denominadas plaquetas.

Las plaquetas son fragmentos celulares producidos en la médula ósea a partir de las células precursoras denominadas megacariocitos. Una vez liberadas al torrente sanguíneo, su vida útil es corta, alrededor de 7 a 10 días. A pesar de su pequeño tamaño, las plaquetas desempeñan un papel crucial en la cascada de coagulación y en la formación del tapón plaquetario para prevenir la pérdida excesiva de sangre en caso de lesiones.

## LA IMUNOHEMATOLOGÍA EN LA RELACIÓN FETO MATERNA

Un recuento plaquetario (RP) inferior a  $100 \times 10^9/l$ , corresponde al que llamamos trombocitopenia, siendo esta condición un hallazgo muy frecuente en el período neonatal, que ocurre, en especial, en niños críticamente enfermos y en prematuros (42).

Dada su alta ocurrencia y la gravedad de sus potenciales efectos, el nivel de plaquetas se debe evaluar no solo en todo niño con sangrado, sino también como control de rutina en todo neonato en estado crítico, así como en los neonatos sanos con algún antecedente familiar de trombocitopenia (42). Sus causas son múltiples, y pueden dividirse en tres grandes grupos:

- Por destrucción aumentada (causas inmunes y causas no Inmunes)
- Por producción disminuida (ocupación o reemplazo o insuficiencia medular)
- Por mecanismo mixto o desconocido

Teniendo en cuenta lo anterior, la inmunohematología plaquetaria en la relación feto materna, estudia las causas de trombocitopenia por destrucción aumentada de origen inmune, en la cual se evidencia la interacción entre los antígenos plaquetarios del feto o del recién nacido y los anticuerpos desarrollados en respuesta a estos antígenos por el sistema inmunológico materno, de igual manera como ocurre en la EHFRN estudiada anteriormente.

### 7.1 Trombocitopenias de causa inmune

El pasaje transplacentario de anticuerpos de la madre al feto puede producir trombocitopenia transitoria en el recién nacido. Según el tipo de anticuerpo, se puede diferenciar entre los siguientes: a) autoanticuerpos: están dirigidos contra un antígeno de las plaquetas maternas, y el niño es el sujeto pasivo de una enfermedad materna que produce trombocitopenia; b) aloanticuerpos: están dirigidos contra un antígeno de las plaquetas fetales ausente en las plaquetas maternas, y el niño es el sujeto activo que sufre las consecuencias de la formación de anticuerpos estimulados por sus plaquetas en su madre sana.

- **Trombocitopenia por autoanticuerpos**

La patología materna en la cual este trastorno ocurre con más frecuencia es la **trombocitopenia inmune primaria** (antes denominada púrpura trombocitopénica idiopática, cuyas siglas PTI fueron de uso extendido), pero puede potencialmente ocurrir en cualquier otra enfermedad autoinmune. La incidencia real de trombocitopenia en hijos de madres con PTI aún no ha sido establecida con claridad, ya que, en los estudios publicados, oscila entre el 16 % y el 56 % (43) (44). Considerando que, en el recién nacido, un RP de  $50 \times 10^9/l$  ha sido definido como seguro, aun en niños enfermos y en prematuros, existe consenso mayoritario para considerar trombocitopenia grave un RP inferior a  $50 \times 10^9/l$ , situación que ocurre en el 8-11 % de los hijos de madres con PTI (43).

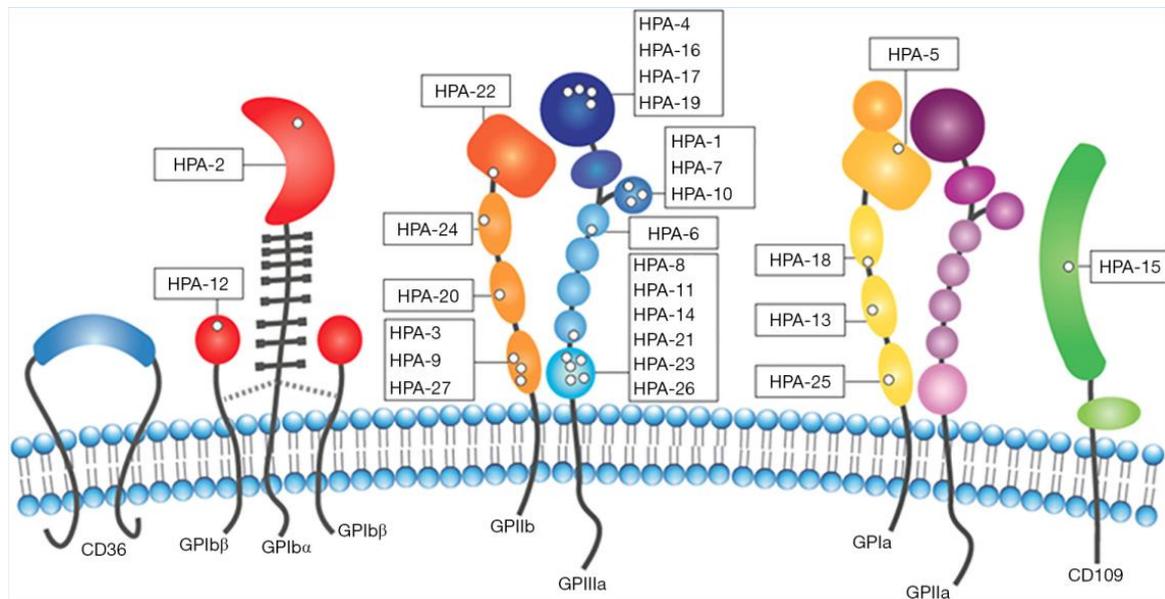
- **Trombocitopenia por aloanticuerpos**

La Trombocitopenia Fetal/Neonatal Aloinmune (TFNA), se produce como consecuencia de la destrucción de las plaquetas fetales/neonatales inducida por aloanticuerpos anti-plaquetarios presentes en el suero materno y dirigidos contra algún antígeno plaquetario específico que el feto o recién nacido (RN) ha heredado del padre. Se trata de una complicación de la gestación potencialmente muy grave, que en las situaciones de trombocitopenia extrema ( $<20 \times 10^9/L$  plaquetas) puede cursar con una hemorragia intracraneal (HIC) en el feto o RN (20 %-30 % de casos) y ocasionarle la muerte o producirle secuelas neurológicas irreversibles (45).

Para comprender los posibles estímulos que pueden generar los antígenos plaquetarios, es importante mencionar que estos antígenos se agrupan en dos grandes categorías: los específicos de estas células (HPA, *del inglés human platelets antigen*) y los antígenos compartidos con otras

# LA IMUNOHEMATOLOGÍA EN LA RELACIÓN FETO MATERNA

células y tejidos (ABO, HLA). Hasta la fecha se han descrito 40 antígenos HPA expresados en 6 glucoproteínas (GP) plaquetarias diferentes: GPIIb, GPIIIa, GPIIb $\alpha$ , GPIIb $\beta$ , GPIIa y CD109 (Imagen N. 06(46)). Para ampliar la información sobre estos los HPA se puede visitar el siguiente link <https://www.versiti.org/products-services/human-platelet-antigen-hpa-database>



**Imagen N°6** Esquema representativo de los Antígenos Plaquetarios Humanos **Fuente:** imagen publicada en el artículo científico de *Chen et al.* (47)

Los Antígenos Plaquetarios Humanos (HPA) son los principales objetivos de los anticuerpos maternos en la TFNA. La detección temprana de los anticuerpos anti-HPA y la identificación de los riesgos potenciales son fundamentales para el manejo adecuado de esta condición.

## 7.2 Fisiopatología de la TFNA

Como se comentó anteriormente, el mecanismo para la producción de TFNA es similar al de la EHFRN. La madre puede presentar aloinmunización contra Ag de los eritrocitos, leucocitos y plaquetas; provocados por embarazos previos, transfusiones previas o recientes, o por el embarazo actual y el feto puede ser afectado por Ac generados por este estímulo. Para que se produzca TFNA, es necesario que el antígeno paterno sea capaz de poseer fuerza en su expresión y ocupar un gran número de sitios antigénicos sobre las GPs de la membrana plaquetaria y estimular la formación de un Ac de clase IgG (46)(48).

## 7.3 Diagnóstico de la TFNA

En la presentación más común se observa un recién nacido de madre sana no trombocitopénico, en la que tanto el embarazo como el parto transcurrieron sin complicaciones. Al momento del parto, o algunas horas después, se aprecia un neonato con púrpura cutánea en forma de petequias o equimosis, que puede acompañarse, en los casos graves, de hematuria, hemorragia digestiva e incluso HIC; por lo que el neonato nace deprimido en grado variable. Los RP igualmente son variables, en casos graves pueden ser inferiores a  $20 \times 10^9$  /L y con tendencia a disminuir en las primeras 24-72 horas (49).

El fenómeno es grave, ya que potencia el desarrollo de hemorragia cerebral entre 10-30 % de los neonatos con resultado de muerte en 10 % de estos. Aproximadamente, 50 % se produce durante

## LA IMUNOHEMATOLOGÍA EN LA RELACIÓN FETO MATERNA

la vida intrauterina, por lo general entre las semanas 30 y 35 de gestación. En casos excepcionales, las hemorragias aparecen antes de las 20 semanas (50)(51).

En casos poco comunes, su presentación puede coincidir con hidrocefalia aislada, anemia fetal de causa no explicada, abortos recurrentes e incluso, hidropesía fetal. Es importante señalar, que los Ag HPA tienen total expresión a partir de las 16 semanas y el paso transplacentario puede ocurrir a partir de las 14 semanas (52)(53)

Cualquier antígeno plaquetario puede estar involucrado en este trastorno, pero el antígeno plaquetario humano 1a (*HPA-1a* por las siglas en inglés de *human platelet antigen 1a*), presente en más del 90 % de la población, es responsable de la mayoría de los casos (75%) seguido por *HPA-3* y *HPA-5*. En las mujeres *HPA-1a* negativas, la capacidad de desarrollar inmunización está asociada, principalmente, con el antígeno leucocitario humano (HLA) DRB3\*0101 (54).

Ante la sospecha clínica de TFNA deben realizarse una serie de estudios dirigidos fundamentalmente a la detección e identificación de aloanticuerpos específicos anti-HPA en el suero materno. También es aconsejable descartar la presencia de autoanticuerpos antiplaquetarios, aunque no haya evidencia del diagnóstico de PTI en la madre (45). Dentro de los estudios serológicos se encuentran las técnicas de citometría de flujo que son ensayos sensibles y rápidos que permiten detectar inmunoglobulinas de los isotipos IgG e IgM reactivas contra plaquetas y son empleadas para evaluar el suero materno contra plaquetas lavadas de ambos progenitores y contra un panel de plaquetas fenotipadas para los antígenos HPA más comunes, procedentes de donantes de grupo O. También se utilizan en la demostración de anticuerpos anti-HLA de clase I (49)(55). Una de las técnicas más utilizadas es la prueba de inmunofluorescencia de plaquetas en suspensión. Las plaquetas maternas son incubadas con suero control anti-HPA que permite la formación del complejo Ag-Ac. Este complejo es marcado con reactivo de antiglobulina humana unido a un fluorocromo [isotiocianato de fluoresceína (FITC)], que se detecta por citometría de flujo (56).

Los ensayos en fase sólida permiten la identificación de la GP contra el cual los Ac maternos son específicos. Uno de los métodos serológicos utilizados, es la técnica de MACE [del inglés modified antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)], donde las plaquetas “blanco” son incubadas con el suero materno, lavadas y lisadas con detergentes aniónico, por ejemplo, triton X-100. La GP de interés es capturada sobre la fase sólida por su unión con el anticuerpo monoclonal específico para esta. Después de varios lavados, el Ac materno unido a la GP retenida es detectado por ELISA (57)(58). Adicionalmente, existe otro método empleado que es la técnica de inmovilización de antígenos plaquetarios con anticuerpos monoclonales (por sus siglas en inglés MAIPA), muy similar a la técnica de MACE y equivalentes en especificidad y sensibilidad (59).

De la misma forma como se incluyó en el apartado de los glóbulos rojos, la determinación del genotipo plaquetario establece un importante hallazgo. Utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se ha podido vencer los problemas de la tipificación serológica, debido a la escasez de antisueros y a las dificultades de interpretación del fenotipo relacionadas con la habitual contaminación de los antisueros con anticuerpos de especificidad de antígeno de histocompatibilidad (HLA). El genotipado HPA del padre permite determinar si este es homocigoto o heterocigoto para el Ag en cuestión. Si es homocigoto, en todos los embarazos siguientes los fetos serán heterocigotos y por consiguiente incompatibles con el Ac materno. Si es heterocigoto, el 50 % tiene la probabilidad de heredar el marcador. El genotipado se puede realizar entre las 8-10 y 18-20 semanas de gestación en muestras de líquido amniótico o vellosidades coriónicas (60).

### 7.4 Tratamiento

## LA IMUNOHEMATOLOGÍA EN LA RELACIÓN FETO MATERNA

El tratamiento inmediato para la trombocitopenia grave (conteos plaquetarios inferiores a  $30 \times 10^9/L$ ) con signos graves de sangramiento evidente (petequias, equimosis, hemorragia gastrointestinal, genitourinario o intracraneal) es la transfusión de plaquetas de donantes fenotipados, con plaquetas carentes del Ag contra el cual se dirige el Ac materno, frescas (menos de 72 h), con volumen reducido, ABO compatibles, citomegalovirus negativo e irradiadas. Si no se cuenta con este tipo de producto, se pueden utilizar plaquetas de donante al azar (con los mismos requerimientos anteriores), que aumentan temporalmente los conteos plaquetarios hasta un valor mínimo y reducen la posibilidad de sangramientos, aun cuando son incompatibles con el Ac materno. En adición, la administración de IgG intravenosa (IVIG) a dosis de 0,4-1 g/kg/d de 2-5 días, permite prolongar la sobrevivencia de las plaquetas incompatibles y disminuir el periodo de trombocitopenia (49). Las plaquetas HPA compatibles también pueden ser obtenidas por plaquetaféresis de la madre del neonato afectado, sobre todo en aquellos casos en los que se requiere un soporte transfusional por un periodo más prolongado (61).

## BIBLIOGRAFIA

1. Inzunza, F. (2011). Enfermedad hemolítica perinatal: manejo de la embarazada RhD negativo. *Rev Chil Obstet Ginecol*, 76(3): 188-206.
2. Darrow, R. (1938). Icterus *gravis* (erythroblastosis) neonatorum. *Arch.Patholo*, 25:378-417.
3. Landsteiner, K., & Wiener, A. (1940). An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for Rhesus blood. *Proc Soc Exp Biol Med* 43(1):223-223.
4. Levine, P. (1941). The role of isoimmunization in transfusion accidents in pregnancy and erythroblastosis fetalis. *Am J Obstet Gynecol*, 42: 165.
5. Tucker, R. (12 de Septiembre de 2020). *How two docs saved millions of babies — and one's own family — with a single shot*. Obtenido de <https://nypost.com/2020/09/12/how-two-docs-saved-millions-of-babies-with-a-single-shot/>
6. Biology, C. U. (2 de december de 2019). Worldwide initiative for RH disease eradication. [https://www.pathology.columbia.edu/news/worldwide-initiative-rh-disease-eradication#:~:text=WIRhE\(link%20is%20external%20and,clearinghouse%20for%20cooperative%20and%20collaborative](https://www.pathology.columbia.edu/news/worldwide-initiative-rh-disease-eradication#:~:text=WIRhE(link%20is%20external%20and,clearinghouse%20for%20cooperative%20and%20collaborative).
7. White, J., Qureshi, H., Massey, E., Needs, M., Byrne, G., & Daniels, G. (2016). Guideline for blood grouping and red cell antibody testing in pregnancy. *Transfusion medicine*, 26(4): 246-263.
8. Dinesh, D. (2005). Review of positive direct antiglobulin tests found on cord blood sampling. *Journal of Paediatrics & Child Health*, 41(9-10): 504-507.
9. Cohn, C., Delaney, M., Johnson, S., & Katz, L. (2020). Technical Manual AABBB. En M. Kennedy, *Medicina transfusional perinatal* (20 Edition ed., págs. 737-753). USA: American Association for the Advancement of Blood & Biotherapies.
10. Haque, K., & Rahman, M. (2000). An unusual case of ABO-haemolytic disease of the newborn. *Bangladesh Med Res Counc Bull.*, 26(2): 61-64.
11. Jain, A., Malhotra, S., Marwaha, N., Kumar, P., & Sharma, R. (2018). Severe ABO hemolytic disease of fetus and newborn requiring blood exchange transfusion. *Asian J Transfus Sci*, 12(2): 176-179.
12. White, J., Qureshi, H., Massey, E., Needs, M., Byrne, G., & Daniels, G. (2016). Guideline for blood grouping and red cell antibody testing in pregnancy. *Transfusion medicine*, 26(4): 246-263.
13. Daniels, G. (2013). Variants of RhD – current testing and clinical consequences. *British Journal of Haematology*, 161: 461-470.
14. Muñoz-Díaz, E., Oyonarte, S., Rodríguez-Villanueva, J., Parra S, J., & Santiago, J. (2008). Protocolo de Diagnóstico y Prevención de la Enfermedad Hemolítica del feto y del recién Nacido. *Sociedad Española de Transfusión Sanguínea y Terapia Celular*.
15. Rivas, G., Marcalain, V., Recouso, J., Silveira, V., Bentos, J., Alonso, V., . . . Blasina, F. (Septiembre de 2021). Guía de manejo obstétrico y del recién nacido en madre aloinmunizada. *Rev. Méd. Urug.*, 37(3): 1-9.

## LA IMUNOHEMATOLOGÍA EN LA RELACIÓN FETO MATERNA

16. Baía, F., Muñiz-Díaz, E., Boto, N., Salgado, M., Montero, R., Ventura, T., . . . Koch, C. (Julio de 2013). A simple approach to confirm the presence of anti-D in sera with presumed anti-D+C specificity. *Blood Transfus*, 11(3): 449-451.
17. BioRad Laboratories- DiaMed GmbH. (2019). *Procedimientos de Titulación- Guía de Buenas Prácticas de Laboratorio*. Obtenido de [www.bio-rad.com/immunohematology](http://www.bio-rad.com/immunohematology) Titration Procedures
18. Cortés Buevas, A., Muñiz-Díaz, E., & León De González, G. (2014). Inmunohematología Básica y Aplicada. En E. Muñiz-Díaz, *Control inmunohematológico de la gestante* (Primera ed., págs. 399-411). Santiago de Cali, Colombia: Grupo Cooperativo Iberoamericano de Medicina Transfusional -GCIAMT.
19. Pediatrics, A. A. (2004). Management of Hyperbilirubinemia in the Newborn Infant 35 or More. En S. o. Hyperbilirubinemia, *CLINICAL PRACTICE GUIDELINE*, 114(1):297-316.
20. J H Clifford, P. M. (1968). Screening for hemolytic disease of the newborn by cord blood testing: analysis of a 5 years experiences. *Clin Pediatr (Phila)*,7(8):465-9.
21. Baptista GH, M. J. (2007). Utilidad de la prueba directa de Coombs en el tamiz neonatal. *Medigraphic*, 66:502-10.
22. Cianciarullo. (2003). Prevalência de marcadores imuno-hematológicos em recém-nascidos ao nascimento e em suas respectivas mães e incidência de doença hemolítica numa maternidade de São Paulo. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 49(1): 45-53
23. Toro Espinosa, L., Jaramillo Arbeláez, P., Gómez, M., Restrepo Restrepo, F., & Franco, J. (2021). Is it necessary to add the eluate testing to the direct antiglobulin test to improve the detection of maternal erythrocyte alloantibodies? *Transfus Apher Sci*, 60(5): 1-5.
24. Barreto Yeiner, M. M. (abril de 2020). Frecuencia de isoinmunización eritrocitaria y caracterización de anticuerpos en neonatos atendidos en una clínica de alto nivel de complejidad en el oriente del departamento de Antioquia, Colombia. *Boletín #4, GCIAMT*, págs. 54-59.
25. Cohn, C., Delaney, M., Johnson, S., & Katz, L. (2020). Technical Manual AABBB. En K. Josephson, *Terapia Transfusional en neonatología y pediatría* (20 Edition ed., págs. 755-785). USA: American Association for the Advancement of Blood & Biotherapies.
26. Peeters, B., Geerts, I., Van Mullem, M., Micalessi, I., Saegeman, V., & Moerman, J. (2016). Post-test probability for neonatal hyperbilirubinemia based on umbilical cord blood bilirubin, direct antiglobulin test, and ABO compatibility results. *Eur J Pediatr*, 175(5): 651-657.
27. Van Rossum HH, d. K. (2015). Comparison of the direct antiglobulin test the eluate for diagnosing haemolytic disease of the newborn. *Pract Lab Med*, 3:17-22.
28. Valsami, S., Politou, M., Boutsikou, T., Briana, D., Papatesta, M., & Malamitsi-Puchner, A. (2015). Importance of Direct Antiglobulin Test (DAT) in Cord Blood: Causes of DAT (+) in a Cohort Study. *Pediatr Neonatol*, 56(4): 256-260.
29. Yogev-Lifshitz, M., Leibovitch, L., Schushan-Eisen, I., Taran, C., Strauss, T., & Maayan-Metzger, A. (2016). Indication of Mild Hemolytic Reaction Among Preterm Infants with ABO Incompatibility. *Pediatr Blood Cancer*, 63(6): 1053-1053.

## LA IMUNOHEMATOLOGÍA EN LA RELACIÓN FETO MATERNA

30. Sociedad Española de Transfusión Sanguínea y Terapia Celular. (2015). Guía sobre la transfusión de componentes sanguíneos y derivados plasmáticos. En S. E. Celular. Barcelona SETS.
31. Dziegiel , M., Krog , G., Hansen, A., Olsen, M., Lausen , B., Nørgaard, L., . . . Clausen F, F. (2021). Laboratory Monitoring of Mother, Fetus, and Newborn in Hemolytic Disease of Fetus and Newborn. *Transfus Med Hemother*, 48(5): 306-3015.
32. Pertl, B., Pieber , D., Panzitt, T., Haeusler , M., Tului, L., & Adinolfi , M. (2000). RhD genotyping by quantitative fluorescent polymerase chain reaction: a new approach. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 107: 1498-1502.
33. Wagner, F., & Flegel, W. (2000). RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood*, 95(12): 3662-3668.
34. Clausen, F., Damkjær, M., & Dziegiel, M. (2014). Noninvasive fetal RhD genotyping. *Transfusion and Apheresis Science*, 50(2): 154-162.
35. Clausen, F. (2017). Non-invasive foetal RhD genotyping in admixed populations. *Blood Transfus*, 15: 4-5.
36. van der Schoot, C., de Haas, M., & Clausen , F. (2017). Genotyping to prevent Rh disease: has the time come? *Curr Opin Hematol.*, 24(6): 544-550.
37. Manfroi, S., Calisesi, C., Fagiani , P., Gabriele, A., Lodi , G., Nucci, S., . . . Randi , V. (2018). Prenatal non-invasive foetal RHD genotyping: diagnostic accuracy of a test as a guide for appropriate administration of antenatal anti-D immunoprophylaxis. *Blood Transfus*, 16(6): 514-524.
38. Sandler, S., Flegel, W., Westhoff, C., Denomme, G., Delaney, M., Keller, M., . . . Simon, C. (2015). 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*, 55: 680-689.
39. Ouchari M, Srivastava K, Romdhane H, Jemni Yacoub S, Flegel WA. (2018) Transfusion strategy for weak D Type 4.0 based on RHD alleles and RH haplotypes in Tunisia. *Transfusion*, 58(2):306-312
40. Flegel WA, Peyrard T, Chiaroni J, Tournamille C, Jamet D, Pirenne F. (2019). A proposal for a rational transfusion strategy in patients of European and North African descent with weak D type 4.0 and 4.1 phenotypes. *Blood Transfus*, 17(2):89-90.
41. Flegel WA, Bodnar M, Clarke G, Hannon J, Lieberman L. (2021). What constitutes the most cautious approach for a pregnant person with weak D type 4.0? *CMAJ*, 14;193(24): E916.
42. Hugo, D. (2021). *Trombocitopenia neonatal: Revisión. I. Definiciones, diagnóstico diferencial, causas, trombocitopenias inmunes*. Buenos Aires: Arch Argent Pediatr, 119(3):e202-e214.
43. Cines DB, D. B. (1982). *Immune thrombocytopenia and pregnancy*. Londres: N Engl J Med. 8;306(14):826-31.
44. Webert KE, M. R. (2003). *A retrospective 11-year analysis of obstetric patients with idiopathic thrombocytopenic purpura*. Londres: Blood;306(14):826-31.

45. Cortés Buelvas, A., Muñiz-Díaz, E., & León De González, G. (2014). Inmunohematología Básica y Aplicada. En C. Canals Surís E. Muñiz-Díaz, Control inmunohematológico de la gestante (Primera ed., págs. 453-466). Santiago de Cali, Colombia: Grupo Cooperativo Iberoamericano de Medicina Transfusional -GCIAMT.
46. Kamphuis MM, P. N. (2014). *Incidence and consequences of neonatal alloimmune thrombocytopenia: a systematic review*. Holanda: Pediatrics,133(4):715-21-
47. Chen, Z., Oswald, B., Sullivan, J., Dahmani., F., Pasmán, Y., Liu, Z., . . . Ni, H. (2019). Platelet physiology and immunology: pathogenesis and treatment of classical and non-classical fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Annals Of Blood*, 4(29):19.
48. Vadasz Brian PC, Y. I. (2015). *Platelets and platelet alloantigens: lessons from human patients and animal models of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia*. Genes Dis, 1;2(2):173-185.
49. Ronzoni S, K. J. (2019). *Management and Neonatal Outcomes of Pregnancies with Fetal/Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia: A Single-Center Retrospective Cohort Study*. Fetal Diagn Ther,45(2):85-93
50. Norton A, A. D. (2004). *Review. Platelet alloantigens and antibodies and clinical significance*. Immunohematology, 2004;20(2):89-102.
51. Winkelhorst D, K. M. (2016). *Severe bleeding complications other than intracranial hemorrhage in neonatal alloimmune thrombocytopenia: a case series and review of the literature*. Transfusion,56(5):1230-1235.
52. Delbos F, B. G.-P. (2016). *Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: predictive factors of intracranial hemorrhage*. Transfusion 56(1):59-66.
53. Santoso S, W. H.-F. (2016). *Antiendothelial alphavbeta3 antibodies are a major cause of intracranial bleeding in fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia*. ArteriosclerThromb Vasc Biol., 36(8):1517-24.
54. Soler G, R. Y. (2019). *Conocimientos actuales sobre la patogénesis, presentación clínica, diagnóstico y manejo de la trombocitopenia neonatal aloimmune*. Habana: Revista Cubana de Pediatría, 91(3): e513.
55. Aebisher D1, B. D. (2017). *Laser flow cytometry as a tool for the advancement of clinical medicine*. Biomed Pharmacother., 85:434-443.
56. Orzińska A, G. K. (2018). *Noninvasive prenatal HPA-1 typing in HPA-1a negative pregnancies selected in the Polish PREVFNAIT screening program*. Transfusion, 58(11):2705-2711.
57. Jain, A., Malhotra, S., Marwaha, N., Kumar, P., & Sharma , R. (2018). Severe ABO hemolytic disease of fetus and newborn requiring blood exchange transfusion. *Asian J Transfus Sci*, 12(2): 176-179.
58. Sarkar RS, P. J. (2015). *Detection and Identification of Platelet-Associated Alloantibodies by a Solid-Phase Modified Antigen Capture Elisa (MACE) Technique and Its Correlation to Platelet Refractoriness in Multi platelet Concentrate Transfused Patients*. Indian J Hematol Blood Transfus., 31(1):77-84.

## LA IMUNOHEMATOLOGÍA EN LA RELACIÓN FETO MATERNA

59. Lucas GF, R. S. (1999). *Evaluation of an enzyme-linked immuno-sorbent assay (GTI PakPlus) for the detection of antibodies against human platelet antigens*. Transf Med. 9(1):63-67.
60. Metzner K, B. J. (2017). *Detection and identification of platelet antibodies using a sensitive multiplex assay system-platelet antibody bead array*. Transfusion, 57(7):1724-1733.
61. Solh Z, B. V. (2016). *Triplets with neonatal alloimmune thrombocytopenia due to antibodies against human platelet antigen 1a*. Transfusion, 56(5):1166-1170.