



COMITÉ DE EDUCACIÓN CONTINUA Y CONTINUADA

COORDINADORA: DRA ANA CLAUDIA PERÓN

PROGRAMA CONSULTA AL EXPERTO

COORDINADORA: DRA GRACIELA LEÓN DE GONZÁLEZ

“BUSCANDO DONANTES RAROS”

PROFESORA INVITADA: CARLA LUADA DINARDO, MD, PhD

Doctora en Medicina y Especialista en Inmunohematología por la Facultad de Medicina de la Universidad de San Pablo- Brasil. Ph en Ciencias en 2015. Fundação Pro-Sangue Hemocentro de São Paulo
caludinardo@gmail.com

Introducción

La búsqueda de donantes raros es una de las tareas esenciales de los laboratorios de inmunohematología (1). Tener pacientes que requieran unidades raras es relativamente poco común, pero puede representar una de las situaciones más estresantes a las que se pueden enfrentar los bancos de sangre. Para satisfacer las necesidades de transfusión de pacientes sensibilizados con fenotipos raros, el servicio debe tener una rutina bien implementada para la búsqueda de donantes raros, utilizando herramientas tanto serológicas como moleculares. Sin embargo, múltiples factores aún dificultan la identificación de donantes raros en todo el mundo.

Para prepararse en la creación de un banco de donantes raros se deben seguir algunos pasos. El objetivo de este manuscrito es describir alternativas para buscar donantes raros utilizando herramientas tanto serológicas como moleculares, así como discutir algunos puntos importantes para que esta tarea tenga buenos rendimientos.

1- ¿Qué debo buscar?

Un determinado fenotipo de eritrocitos se considera raro si presenta una frecuencia inferior a 1:1.000 individuos. Hay dos tipos diferentes de donantes raros. El primero comprende donantes que carecen de antígenos de alta frecuencia poblacional mientras que el segundo corresponde a donantes con tipificación negativa para múltiples antígenos eritrocíticos de frecuencia poblacional intermedia. Un banco de donantes raros debe incluir ambos tipos de donantes y las estrategias aplicadas para identificar cada grupo difieren.

Los fenotipos considerados raros varían según la ascendencia étnica de la población (2). Más comúnmente Fy (ab-); Js (b-); U-; Hy-, Jo(a-); los fenotipos Fy3 se encuentran en donantes de ascendencia africana. Por otro lado, se encuentran otros fenotipos en donantes de origen étnico bastante diverso como Jk (ab-) (tailandeses); Ah (indios); Ge:-2,-3,4 (melanesios), Jr(a)- (japoneses); Vel - (caucásicos) y Di(b)- (nativos americanos). Esta información es importante para identificar el grupo de donantes a incluir en el protocolo de búsqueda, aumentando las probabilidades de identificar la rareza.

La Sociedad Internacional de Transfusión de Sangre (ISBT) tiene un grupo de trabajo dedicado a centralizar la información sobre donantes raros en todo el mundo. En una importante publicación de este equipo (3), se proporcionó una descripción de la heterogeneidad de los fenotipos raros que necesitan los países que actualmente trabajan con donantes raros. En el texto se puede comprobar, que en países de población mayoritariamente caucásica, como Alemania, son difíciles de encontrar fenotipos típicamente asociados a ascendencia africana, como Fy (a-b-); U-; Gy (a-); Hy-; Jo(a-); Js (b-). Por otro lado, si nos fijamos en Sudáfrica, los fenotipos más difíciles son totalmente diversos: Ge-; Lan-; Jk (a-b-), Lu:- 5; PP₁ P^k-. El mensaje que nos deja esta publicación es que saber qué necesita una determinada población es crucial para establecer un buen programa de donantes raros.

El primer paso para seleccionar los fenotipos a buscar en una determinada ubicación es observar detenidamente las especificidades de los anticuerpos contra antígenos de alta frecuencia que tienen los pacientes. Los antígenos implicados más comúnmente deben ser los primeros en seleccionarse para el cribado serológico o molecular. Además, implementar una rutina de almacenamiento de sueros raros y convocar a los hermanos

de pacientes con anticuerpos raros para realizar el fenotipado/genotipado es una estrategia importante en el programa de donantes raros. El segundo paso es evaluar el origen étnico de la población de pacientes multitransfundidos. En el caso de pacientes con anemia de células falciformes (SCD), el objetivo debe ser conseguir fenotipos raros de origen africano. Por otro lado, si la población de pacientes más transfundida y aloimmunizada es de origen caucásico o nativo americano, entonces el protocolo debe modificarse en consecuencia.

2- ¿Cómo debo buscar donantes raros?

Métodos serológicos

Los antisueros comerciales no están disponibles para la mayoría de los antígenos de alta frecuencia. Sin embargo, fenotipar de forma rutinaria parte de los donantes es crucial para identificar algunos fenotipos raros. Hay algunos fenotipos negativos que pueden identificarse utilizando antisueros comerciales convencionales como Fy (ab-); Jk (ab-); Ss-; MN- y Kp (b)-. Otros pueden evaluarse mediante la identificación de los antígenos antitéticos de baja frecuencia usando antisueros comerciales (Di(a)+; Js (a)+; Kp (a)+; K+).

El uso de sueros humanos también es posible y requiere un inventario de muestras congeladas de pacientes que presenten anticuerpos. Es obligatorio validar estos datos de entrada antes de utilizarlos en la rutina y lo más importante, siempre se debe probar un control positivo en paralelo. En caso de un resultado negativo, se requiere confirmación molecular para evitar resultados falsos negativos debido a variantes que causan una baja expresión del antígeno.

Métodos moleculares

Existen múltiples ensayos moleculares descritos para el genotipado de glóbulos rojos que pueden usarse para la búsqueda de fenotipos raros. Sin embargo, un buen programa de búsqueda de donantes raros siempre debe incluir herramientas tanto serológicas como moleculares para que sea rentable. No se recomienda genotipificar aleatoriamente a los donantes de sangre para identificar la rareza a menos que los recursos para el genotipado sean ilimitados. Si ese no es el caso, el flujo de trabajo más apropiado es comenzar con el fenotipado y luego pasar al genotipado.

Muchos laboratorios de inmunohematología han utilizado durante décadas métodos moleculares convencionales principalmente la reacción en cadena de polimerasa alelo específica (Allele Specific (AS)-PCR siglas en inglés) y PCR de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)-PCR, siglas en inglés) para genotipar todos los genes que codifican antígenos de glóbulos rojos. Aunque los ensayos sólo permiten en la mayoría de los casos la genotipificación de una variación genética por reacción, estos métodos pueden estar indicados para la confirmación de fenotipos antígeno negativos identificados por serología. Por ejemplo, los casos sospechosos de fenotipo U se pueden confirmar y distinguir del fenotipo Uvar mediante PCR convencional. Esto también es válido para otras situaciones de fenotipos antígeno negativos que deben confirmarse para excluir variantes que causan la reducción de la expresión del antígeno, como Vel - y k-. La mayor ventaja de estos métodos es que el costo es muy bajo y la infraestructura requerida para los ensayos es bastante básica. Sin embargo, la limitación en cuanto a muestras y antígenos evaluados por reacción es un inconveniente importante.

Las técnicas de matriz de ADN son una gran opción para la búsqueda de genotipos raros (4,5). El principio de este método es la hibridación de múltiples sondas (oligonucleótidos que codifican antígenos de glóbulos rojos) con el ADN estudiado. Se pueden analizar múltiples muestras y múltiples alelos de glóbulos rojos en cada lote y el tiempo *práctico* es mucho menor que el requerido para los métodos moleculares convencionales. Hasta ahora, disponemos de algunas opciones comerciales de matrices de ADN para el genotipado de glóbulos rojos. Los más importantes son el HEA BeadChip™ (Immucor, EE. UU.) y BloodChip™ (Grifols, Barcelona), ambos validados mediante múltiples estudios y que comprenden los antígenos de glóbulos rojos clínicamente relevantes.

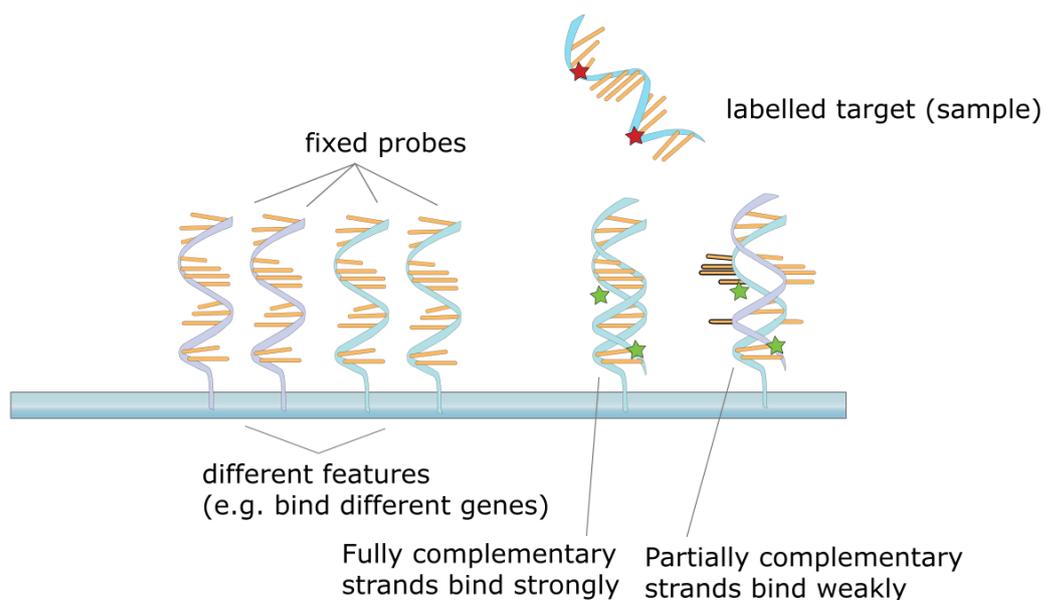


Figura 1. Principio del método de matriz de ADN. Por Squidonius (discusión) - Trabajo propio (Dominio público original, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=39422948>)

La aplicación más racional de los métodos de matriz de ADN para buscar donantes raros es utilizar los resultados serológicos como criterio para seleccionar las muestras que se van a analizar. En este sentido, seleccionar muestras de donantes autodeclarados negros y con fenotipo de eritrocitos extendido sugestivo de esta ascendencia africana

(R0r; Fy (a)-; Jk (b)-; S- o Fy (ab-)) para ADN. La prueba de matriz es una buena opción para identificar fenotipos raros como Hy-, Jo(a)-, Js (b)-. Por otro lado, si el objetivo es identificar fenotipos raros identificados más comúnmente entre los caucásicos, entonces los criterios fenotípicos extendidos deberían ser diferentes. En todos los casos, realizar pruebas a los donantes repetidos de sangre es siempre la mejor estrategia para aumentar las probabilidades de contar con el donante cuando se necesita una unidad rara. Si el país no tiene un porcentaje significativo de donantes recurrentes, entonces es crucial la posibilidad de dedicar esfuerzos para mantener a los donantes raros después de la identificación.

Además de la matriz de ADN, la secuenciación de ADN se puede utilizar para la búsqueda de fenotipos raros. Se han probado y validado diversas plataformas de secuenciación de nueva generación (NGS) para genotipar antígenos de glóbulos rojos (6,7). Este método permite la secuenciación de múltiples muestras por lote, aunque el desarrollo de canales para el análisis de los datos generados sigue siendo un desafío. Sin embargo, considerando lo rápido que están disminuyendo los precios de la secuenciación del exoma o del genoma completo (Figura 2), se puede prever que, en el futuro, los bancos de sangre tendrán el genoma completo de los donantes y de ello se derivará la identificación de genotipos raros. Este futuro no está tan lejos, ya que contamos con canales dedicados a predecir fenotipos de glóbulos rojos a partir de datos de secuenciación del genoma completo (8).

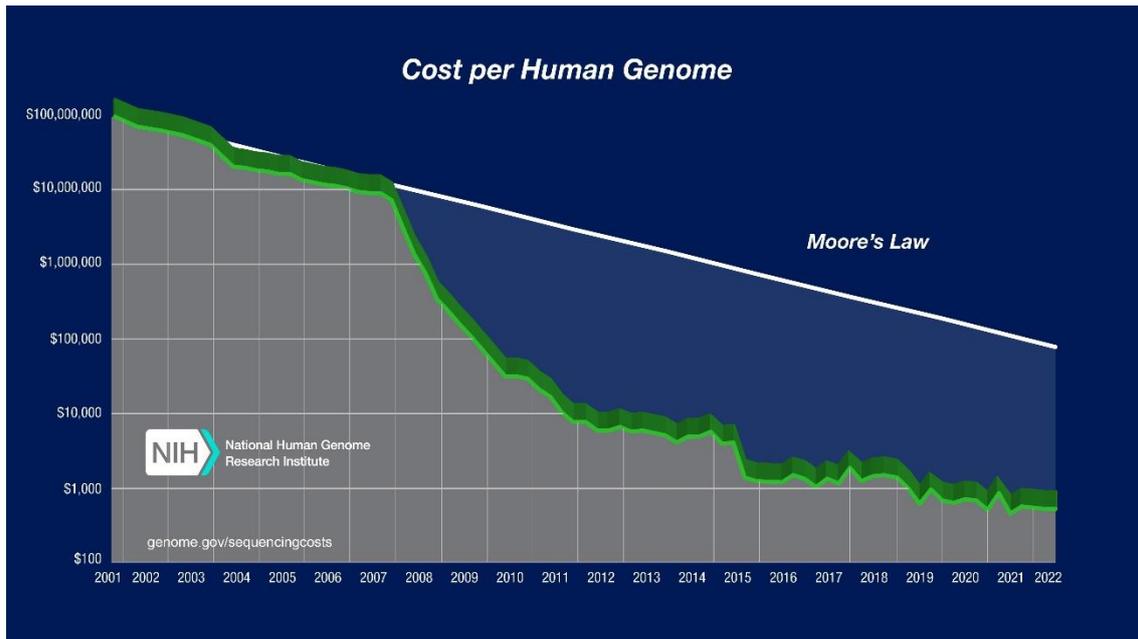


Figura 2. Costo por genoma, 2022. <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Sequencing-Human-Genome-cost>

3- ¿Cómo debo cuidar mi banco de donantes raros?

Después de la identificación de un donante raro, el banco de sangre puede congelar la unidad correspondiente y descongelarla cuando sea necesario. El protocolo de congelación implica el uso de glicerol y requiere infraestructura para almacenar las unidades congeladas. Lamentablemente, esta no es la realidad para muchos bancos de sangre.

Una estrategia alternativa es crear un grupo de donantes raros en el banco de sangre y establecer comunicación directa con ellos. Esto comienza con informar al donante sobre la rareza encontrada y las implicaciones que tiene. Es importante resaltar que este donante solo debe donar sangre si se le solicita, para evitar situaciones en las que se necesita la unidad rara pero el donante ha donado recientemente. También se recomienda identificar a los hermanos de donantes raros y pedirles que se hagan la prueba. Finalmente, inscribir a los donantes en un programa nacional o continental de

donantes raros ayuda a centralizar las rarezas regionales y satisfacer las necesidades de transfusión de más pacientes.

4- Desafíos

Uno de los factores más relevantes que impacta negativamente en la búsqueda exitosa de donantes raros es la disponibilidad de herramientas serológicas o moleculares para identificar fenotipos raros, que es altamente heterogénea entre los países (y a veces incluso dentro de un país en particular). En cuanto a los insumos serológicos, sólo los laboratorios de inmunohematología con un alto nivel de experiencia cuentan con antisueros humanos o comerciales dirigidos a antígenos de alta frecuencia disponibles para tipificar a los donantes de forma rutinaria. Esto se ve agravado aún más por la escasez de consorcios internacionales para intercambiar sueros/glóbulos rojos raros, especialmente para los países en desarrollo. En muchos países, los ensayos moleculares, como la matriz de ADN o la secuenciación, todavía están restringidos a unos pocos laboratorios de referencia. En consecuencia, el número de donantes raros identificados está por debajo de lo esperado.

Otro factor crítico que limita la búsqueda de donantes raros es la falta de protocolos apropiados geográficamente, teniendo en cuenta el origen étnico de los donantes. Los servicios deben contar con protocolos de identificación de donantes raros claramente descritos y los resultados deben ser monitoreados continuamente. Si no se aplican protocolos, los costos asociados con la búsqueda de donantes raros pueden resultar inasequibles para muchos países.

Finalmente, existe una gran diferencia entre identificar un fenotipo/genotipo raro y tener efectivamente al donante raro disponible para una donación una vez solicitada. La congelación de unidades de glóbulos rojos raros es la mejor alternativa para garantizar la disponibilidad del producto durante un período prolongado, pero lamentablemente esto requiere experiencia técnica e infraestructura de laboratorio que no están disponibles en muchos lugares. Además, el transporte internacional de unidades raras entre países sigue siendo un desafío para algunos países, especialmente considerando los altos costos y la legislación local específica.

5- Oportunidades

¿Cómo podemos identificar donantes raros y hacer que sus unidades estén disponibles de manera más efectiva? El primer paso es la educación. La difusión de ejemplos exitosos de identificación y registro de unidades y donantes raros, como el del American Rare Donor Program (9) o el International Rare Donor Panel (10), ayuda a los centros de inmunohematología de todo el mundo a comenzar a implementar su búsqueda local de fenotipos raros. El segundo paso es aumentar la disponibilidad de herramientas moleculares para el genotipado de glóbulos rojos en los países en desarrollo, considerando que los costos asociados con el genotipado se están reduciendo progresivamente y que esto puede aumentar la efectividad de la identificación de donantes raros. Y por último (pero no menos importante), mejorar la colaboración internacional para registrar donantes raros y reducir las dificultades y retrasos asociados con el transporte de unidades raras. ¡Juntos somos fuertes!

Referencias

- 1- Nance S, Scharberg EA, Thornton N, Yahalom V, Sareneva I, Lomas-Francis C. International rare donor panels: a review. *Vox Sang.* 2016 Apr;110(3):209-18. doi: 10.1111/vox.12357. Epub 2015 Dec 21. PMID: 26689301.
- 2- Reesink HW, Engelfriet CP, Schennach H, Gassner C, Wendel S, Fontão-Wendel R, de Brito MA, Sistonen P, Matilainen J, Peyrard T, Pham BN, Rouger P, Le Pennec PY, Flegel WA, von Zabern I, Lin CK, Tsoi WC, Hoffer I, Barotine-Toth K, Joshi SR, Vasantha K, Yahalom V, Asher O, Levene C, Villa MA, Revelli N, Greppi N, Marconi M, Tani Y, Folman CC, de Haas M, Koopman MM, Beckers E, Gounder DS, Flanagan P, Wall L, Aranburu Urtasun E, Hustinx H, Niederhauser C, Flickinger C, Nance SJ, Meny GM. Donors with a rare pheno (geno) type. *Vox Sang.* 2008 Oct;95(3):236-53. doi: 10.1111/j.1423-0410.2008.01084.x. PMID: 19121189.
- 3- Nance, S.T. (2013), Global definitions of rare donors. *VOXS*, 8: 23-27. <https://doi.org/10.1111/voxs.12006>
- 4- Denomme GA, Schanen MJ. Mass-scale donor red cell genotyping using real-time array technology. *Immunohematology.* 2015;31(2):69-74. PMID: 26495892.
- 5- Veldhuisen B, van der Schoot CE, de Haas M. Blood group genotyping: from patient to high-throughput donor screening. *Vox Sang.* 2009 Oct;97(3):198-206. doi: 10.1111/j.1423-0410.2009.01209.x. Epub 2009 Jun 22. PMID: 19548962.
- 6- Fichou Y, Férec C. NGS and blood group systems: State of the art and perspectives. *Transfus Clin Biol.* 2017 Sep;24(3):240-244. doi: 10.1016/j.tracli.2017.06.002. Epub 2017 Jun 21. PMID: 28645642.
- 7- Fichou Y, Mariez M, Le Maréchal C, Férec C. The experience of extended blood group genotyping by next-generation sequencing (NGS): investigation of patients with sickle-cell disease. *Vox Sang.* 2016 Nov;111(4):418-424. doi: 10.1111/vox.12432. Epub 2016 Jul 21. PMID: 27442304.

- 8-] William J. Lane, Connie M. Westhoff, Nicholas S. Gleadall, Maria Aguad, Robin Smeland-Wagman, Sunitha Vege, Daimon P. Simmons, Helen H. Mah, Matthew S. Lebo, Klaudia Walter, Nicole Soranzo, Emanuele Di Angelantonio, John Danesh, David J. Roberts, Nick A. Watkins, Willem H. Ouwehand, Adam S. Butterworth, Richard M. Kaufman, Heidi L. Rehm, Leslie E. Silberstein, Robert C. Green, David W. Bates, Carrie Blout, Kurt D. Christensen, Allison L. Cirino, Carolyn Y. Ho, Joel B. Krier, Lisa S. Lehmann, Calum A. MacRae, Cynthia C. Morton, Denise L. Perry, Christine E. Seidman, Shamil R. Sunyaev, Jason L. Vassy, Erica Schonman, Tiffany Nguyen, Eleanor Steffens, Wendi Nicole Betting, Samuel J. Aronson, Ozge CeyhanBirsoy, Kalotina Machini, Heather M. McLaughlin, Danielle R. Azzariti, Ellen A. Tsai, Jennifer Blumenthal-Barby, Lindsay Z. Feuerman, Amy L. McGuire, Kaitlyn Lee, Jill O. Robinson, Melody J. Slashinski, Pamela M. Diamond, Kelly Davis, Peter A. Ubel, Peter Kraft, J. Scott Roberts, Judy E. Garber, Tina Hambuch, Michael F. Murray, Isaac Kohane, and Sek Won Kong. Automated typing of red blood cell and platelet antigens: a whole-genome sequencing study. *The Lancet Haematology*, 5(6): e241–e251, 2018. ISSN 23523026. doi: 10.1016/S2352-3026(18)30053-X.
- 9- Flickinger C. REGGI and the American Rare Donor Program. *Transfus Med Hemother*. 2014 Oct;41(5):342-5. doi: 10.1159/000366149. Epub 2014 Sep 16. PMID: 25538535; PMCID: PMC4264493.
- 10- Woodfield G, Poole J, Nance ST, *et al.*: A review of the ISBT rare blood donor program. *Immunohematology* 2004; 4: 244– 248