

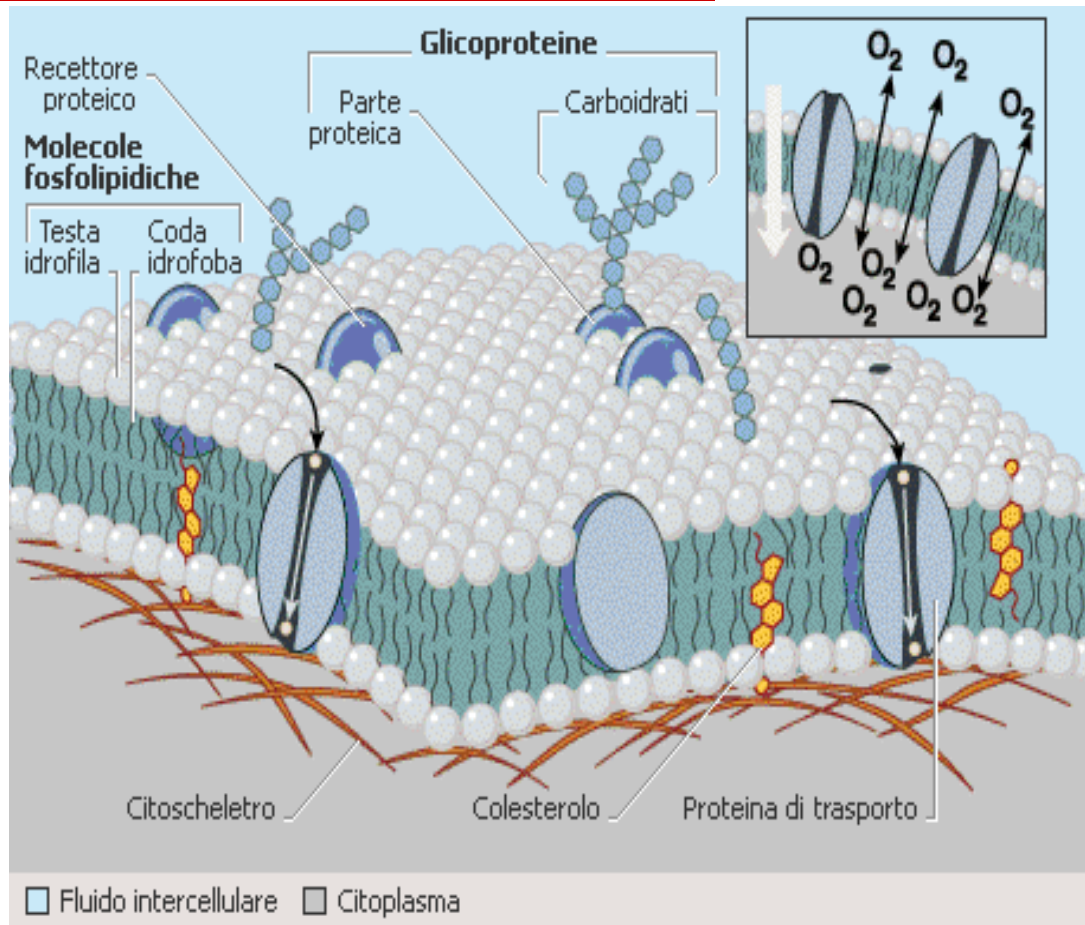
---

A microscopic image showing numerous red blood cells (erythrocytes) in various orientations. The cells are biconcave discs, appearing as reddish-orange structures with a darker center. They are set against a dark background, with a portion of a green, textured surface visible on the right side. The text "Il sistema Rh" is overlaid in white, bold font across the center of the image.

# Il sistema Rh

---

# Il sistema Rh



1939

**Landmark Article**  
 DOI: 10.1001/AMA.1939.13101210121  
 (LAMA 1939;131:121-127)

**An Unusual Case of Intra-group Agglutination**  
 Philip Levine, M.D., Newark, N. J., and Rufus E. Stetson, M.D., New York

This report deals with a rare property in the blood of a patient whose serum showed no agglutination of standard activity, which agglutinated about 80 per cent of the blood of her own group. In view of the fact that this agglutination tended to disappear after an interval of several months and the fact that the agglutination given in reciprocal mixing with red cells of other groups was especially strong, the blood was typed as C. It would seem, therefore, that the agglutination resulting from immunization following repeated transfusions. This phenomenon is readily reproduced in some species (rat, chicken, rabbit). In several instances of such immunization to a variety of antigens, as described in the literature, the case is described as follows: That is, the immune agglutination need have been obtained by a factor other than repeated transfusions. The nature of this factor becomes evident from a summary of the case history.

**REPORT OF CASE**

M. S., a woman aged 21 1/2 months, was admitted to the maternity ward of Bellevue Hospital July 12, 1937, at which time she showed some prothrombin and blood pressure of 110/70 mm. Hg. The mother had a history of a stillborn child in October, 1935, weeks after the third pregnancy and still viable. The stillborn child was a female of about 10 to 12 weeks' gestation and had resulted in a large but not a very large placenta. The placental vessels were not ligated but were cut by a sharp razor blade.

Later pains and vaginal bleeding started on September 8 the third child week of the gestation, and a normal laboration commenced.

From the Department of Laboratory Research, New York Hospital, New York, N. Y., and the Blood Transfusion Reference Association of New York City.

The authors are indebted to Dr. Wm. A. Linton, member of the Board of Directors, and Dr. Wm. A. Linton, member of the Board of Directors, of the Blood Transfusion Reference Association of New York City.

Received for publication, June 15, 1938. Accepted for publication, June 15, 1938.

Reprints: Dr. Philip Levine, 100 West 11th St., New York, N. Y., or Dr. Rufus E. Stetson, 100 West 11th St., New York, N. Y.

© 1939 by American Medical Association. All rights reserved. Printed in U. S. A.

Levine & Stetson descrivono il caso di una donna che, dopo aver partorito un bambino affetto da eritroblastosi, ha una reazione emolitica con una trasfusione di sangue del marito.







---

**1940**

Landsteiner & Wiener iniettano eritrociti di Rhesus-monkey in conigli.

Il siero dei conigli agglutina gli eritrociti del Rhesus-monkey



---

**1940**

Landsteiner & Wiener iniettano eritrociti di Rhesus-monkey in conigli.

Il siero dei conigli agglutina gli eritrociti del Rhesus-monkey e dell' 85% di eritrociti umani.

Chiamano questo anticorpo anti-Rh.



---

### **1940**

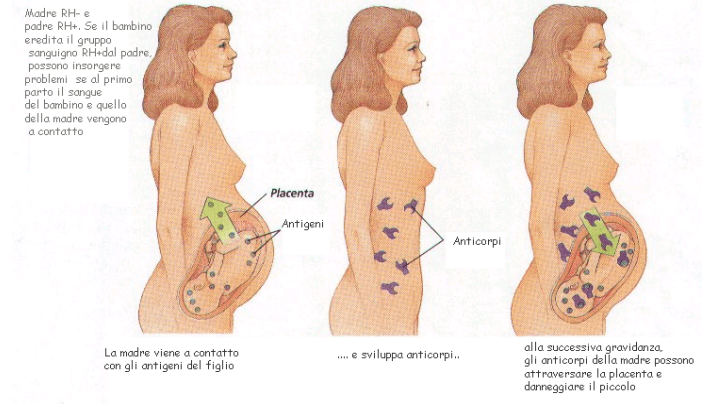
Landsteiner & Wiener iniettano eritrociti di Rhesus-monkey in conigli.

Il siero dei conigli agglutina gli eritrociti del Rhesus-monkey e dell' 85% di eritrociti umani.

Chiamano questo anticorpo anti-Rh.

### **1941**

L'anticorpo umano di Levine & Stetson mostra lo stesso pattern di reattività dell'anticorpo anti-Rh del coniglio.

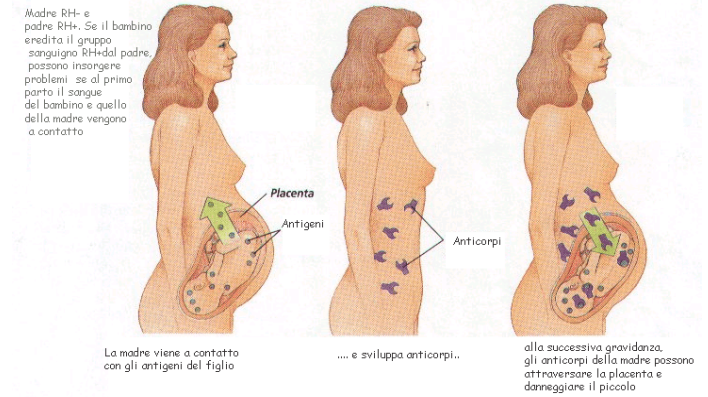


---

**1942**

Levine conferma che l'incompatibilità Rh tra madre e feto era la causa della malattia emolitica del neonato (MEN).

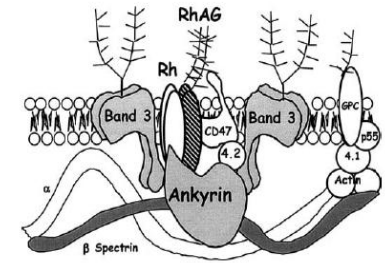




## 1942

Levine conferma che l'incompatibilità Rh tra madre e feto era la causa della malattia emolitica del neonato (MEN).

Diversi studi dimostrano che, in base al tipo di popolazione, il 3-25% degli individui mancano dell'antigene D **del sistema Rh**, e che gli individui RhD-negativi possono rapidamente produrre anti-D.



**1963**

---

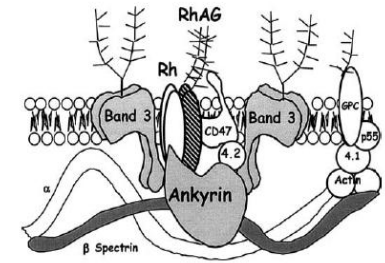
Levine et al. dimostrano che l'anti-Rh umano e del coniglio non reagiscono con lo stesso antigene.



---

**1941**

L'anticorpo umano di Levine & Stetson mostra lo stesso pattern di reattività dell'anticorpo anti-Rh del coniglio.



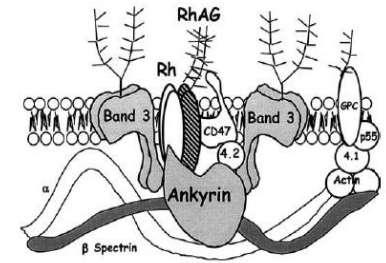
**1963**

---

Levine et al. dimostrano che l'anti-Rh umano e del coniglio non reagiscono con lo stesso antigene.

Ciononostante, nell'uso corrente, il termine "Rh" viene conservato per indicare l'anticorpo umano.

*L'anti-Rh' del coniglio viene chiamato anti-LW in onore di Landsteiner & Wiener.*



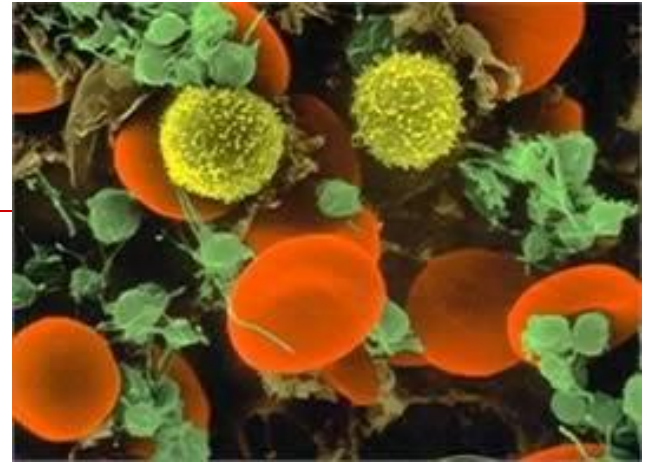
---

Anche oggi si commette l'errore di riferirsi al sistema gruppo-ematico 'Rhesus'.

Questo non è corretto poichè l'antigene non ha niente a che fare con il Rhesus-monkey.

Ci si dovrebbe riferire piuttosto al sistema gruppo-ematico 'Rh'.

---



Gli antigeni Rh sono pienamente espressi alla nascita e sono precocemente rilevabili sin dalla **ottava settimana** di gestazione.

Sono presenti solo sui globuli rossi, mentre non sono rilevabili sulle piastrine, sui linfociti, sui monociti, sui neutrofili o in altri tessuti.

---

---

Il fattore Rhesus è clinicamente il più importante sistema gruppo-ematico di natura proteica.

La sua significatività clinica è seconda solo a quella del sistema ABO.

Con i suoi **54** antigeni rappresenta il più grande dei 33 sistemi gruppo-ematici oggi conosciuti.

---

Dalla metà degli anni '40, quattro ulteriori antigeni

**C, E, c, e**

vennero riconosciuti come facenti parte di quello che viene attualmente definito come il sistema Rh.



Dalla metà degli anni '40, quattro ulteriori antigeni -C, E, c, e- vennero riconosciuti come facenti parte di quello che viene attualmente definito come il sistema Rh.

---

I cinque più importanti antigeni Rhesus sono la causa della maggior parte delle

alloimmunizzazioni

post- trasfusionali.

Dalla metà degli anni '40, quattro ulteriori antigeni -C, E, c, e- vennero riconosciuti come facenti parte di quello che viene attualmente definito come il sistema Rh.

---

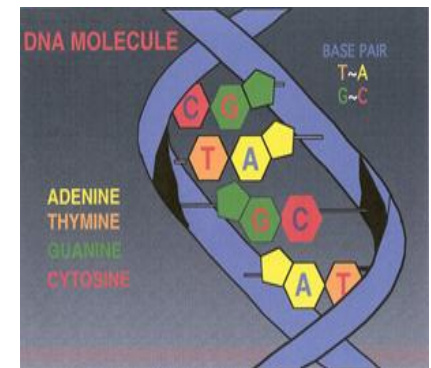
I cinque più importanti antigeni Rhesus sono la causa della maggior parte delle alloimmunizzazioni post-trasfusionali.

Successive scoperte hanno portato il numero degli antigeni correlati col sistema Rh a 54.



---

## **Le basi molecolari**



---

**1990**

Viene identificato il primo gene Rhesus: RHCE;

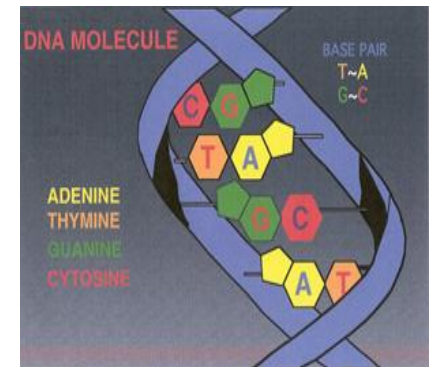
2 anni più tardi viene identificato il gene RHD.

**1990**

Viene identificato il primo gene Rhesus: RHCE;

2 anni più tardi viene identificato il gene RHD.

---



Il gene RHD determina la presenza della proteina che attraversa ripetutamente la membrana eritrocitaria e conferisce la specificità antigenica D.

Il gene RHCE con i suoi alleli RHCE, RHcE ed Rhce, è quello che determina gli antigeni C, c, E ed e.

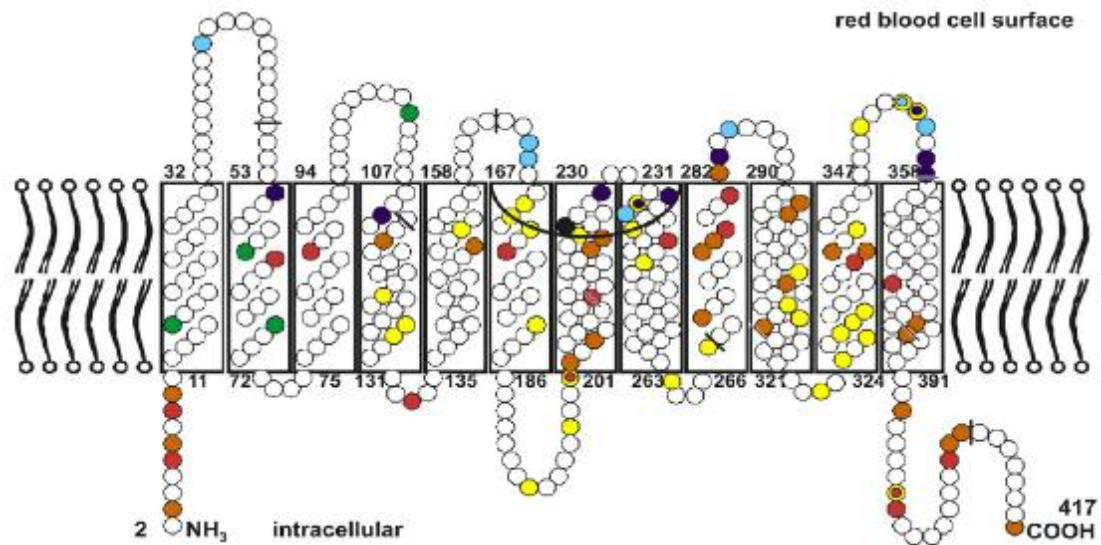
I due geni sono localizzati sul braccio corto del cromosoma 1

---

I due geni (RHD e RHCE) sono altamente omologhi (93.8%) e sono organizzati in dieci esoni.

Il gene RHD deriverebbe dalla duplicazione di un originale gene RH durante l'evoluzione.

I prodotti di entrambi i geni RHD ed RHCE sono proteine di 417 aminoacidi che attraversano per 12 volte la membrana eritrocitaria, formando solo brevi anse esterne di aminoacidi.



Le proteine RhD e RhCcEe differiscono per 31-35 aminoacidi.

---

Gli antigeni C e c si differenziano uno dall'altro solamente per quattro amminoacidi;

*di queste differenze, solo quella tra la serina e la prolina nella posizione 103 sembra essere l'elemento critico.*

La presenza della prolina o dell'alanina nella posizione 226 differenzia, invece, E da e.



---

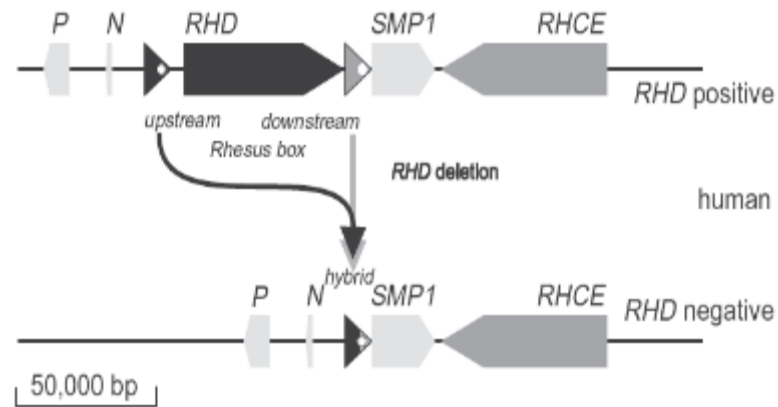
L'82%-88% degli Europei e dei caucasici nord Americani sono D-positivi.

Circa il 95% dei neri Africani sono D-positivi.

Il D è un antigene ad alta frequenza nell'est asiatico, raggiunge il 100% in alcune popolazioni.

## 1991

Viene dimostrato che nella popolazione bianca la maggior parte degli individui RhD-negativi manca completamente del gene RHD.



(from Flegel. *Transfusion and Apheresis Science* 2011)

---

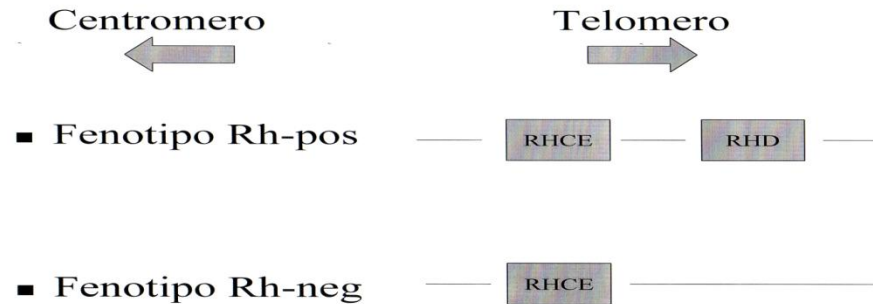
Mentre nei soggetti caucasici D-negativi il gene RHD è deletato, in altre popolazioni (soggetti di origine africana, giapponesi e cinesi) il fenotipo D negativo è associato ad un gene RHD inattivo, mutato o parziale.

---

Circa il 67% dei neri africani presenta un gene RHD inattivo o pseudogene (RHD $\psi$ ) responsabile del fenotipo D-negativo. RHD $\psi$  presenta uno stop codon nell'esone 6.

Sono stati anche descritti geni RHD contenenti mutazioni non senso e delezioni di nucleotidi in alcuni giapponesi D-negativi e in donatori bianchi.

### Rappresentazione schematica del locus RH



Il gene RHCE, che produce gli antigeni C ed E, è veramente raro negli individui D negativi e D positivi

---

**C, E, c, e**

---

D/d

C/c

E/e

**C, E, c, e**

---

D/d

C/c

E/e

## **Alleli**

una delle forme alternative che un gene può assumere nel medesimo sito ( *locus* ) cromosomico;

spesso l'effetto di uno dei due alleli (detto *dominante* ) è prevalente ai fini dell'espressione del carattere, rispetto a quello dell'altro allele (detto *recessivo* ).

**C, E, c, e**

---

DD-Dd-dd

C/c

E/e



**C, E, c, e**

---

DD-Dd-dd

CC-Cc-cc

E/e

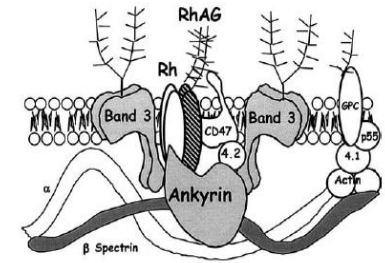
**C, E, c, e**

---

DD-Dd-dd

CC-Cc-cc

EE-Ee-ee



---

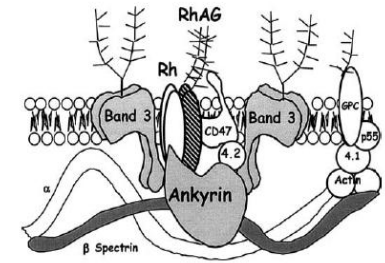
La teoria di Fisher-Race dei tre loci (D/d C/c E/e) è ancora utilizzata nell'interpretazione dei dati sierologici

3 paia di alleli

Cc Dd Ee

determinano 8 possibili aplotipi CDE

---



---

La teoria di Fisher-Race dei tre loci (D/d C/c E/e) è ancora utilizzata nell'interpretazione dei dati sierologici

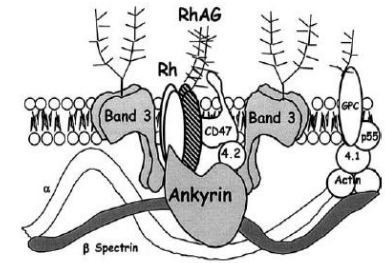
3 paia di alleli

Cc Dd Ee

determinano 8 possibili aplotipi CDE

In genetica, particolare combinazione lineare di alleli in una determinata regione cromosomica

---



---

La teoria di Fisher-Race dei tre loci (D/d C/c E/e) è ancora utilizzata nell'interpretazione dei dati sierologici

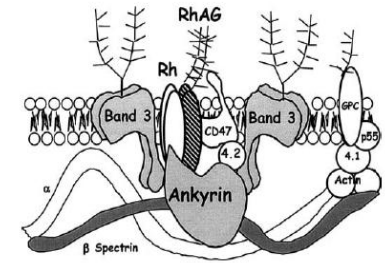
3 paia di alleli

Cc Dd Ee

determinano 8 possibili aplotipi CDE

CdE

---



---

La teoria di Fisher-Race dei tre loci (D/d C/c E/e) è ancora utilizzata nell'interpretazione dei dati sierologici

3 paia di alleli

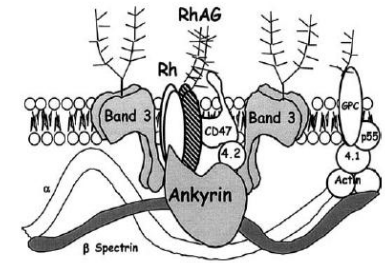
Cc Dd Ee

determinano 8 possibili aplotipi CDE

CdE

cDE

---



---

La teoria di Fisher-Race dei tre loci (D/d C/c E/e) è ancora utilizzata nell'interpretazione dei dati sierologici

3 paia di alleli

Cc Dd Ee

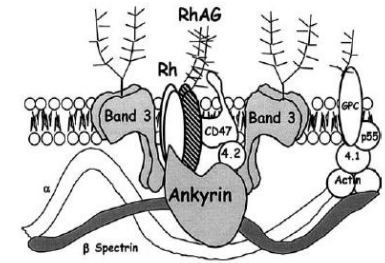
determinano 8 possibili aplotipi CDE

CdE

cDE

cdE

---



---

La teoria di Fisher-Race dei tre loci (D/d C/c E/e) è ancora utilizzata nell'interpretazione dei dati sierologici

3 paia di alleli

Cc Dd Ee

determinano 8 possibili aplotipi CDE

CdE

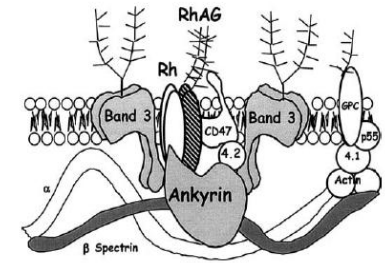
cDE

cdE

CDe

---





---

La teoria di Fisher-Race dei tre loci (D/d C/c E/e) è ancora utilizzata nell'interpretazione dei dati sierologici

3 paia di alleli

Cc Dd Ee

determinano 8 possibili aplotipi

CDE

CdE

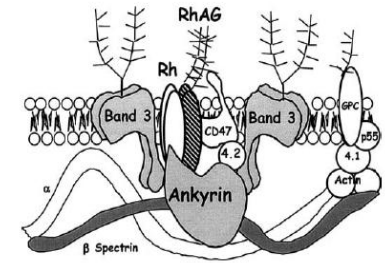
cDE

cdE

CDe

Cde

---



---

La teoria di Fisher-Race dei tre loci (D/d C/c E/e) è ancora utilizzata nell'interpretazione dei dati sierologici

3 paia di alleli

Cc Dd Ee

determinano 8 possibili aplotipi

CDE

CdE

cDE

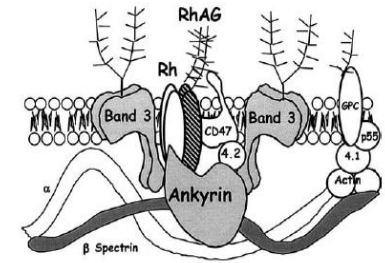
cdE

CDe

Cde

cde

---



---

La teoria di Fisher-Race dei tre loci (D/d C/c E/e) è ancora utilizzata nell'interpretazione dei dati sierologici

3 paia di alleli

Cc Dd Ee

determinano 8 possibili aplotipi

CDE

CdE

cDE

cdE

CDe

Cde

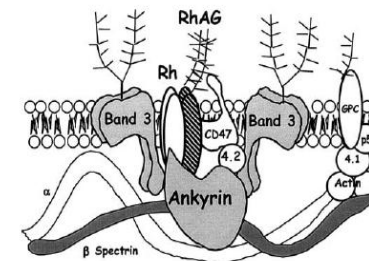
cde

cDe

---

**8 aplotipi CDE CdE cDE cdE CDe Cde cde cDe**

---



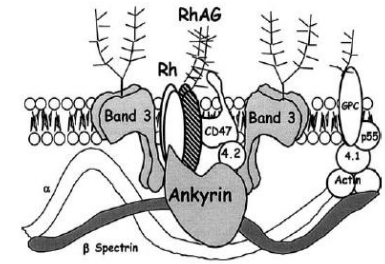
**formano differenti genotipi**

CDE/CDE

---

## 8 aplotipi CDE CdE cDE cdE CDe Cde cde cDe

---



**formano differenti genotipi**

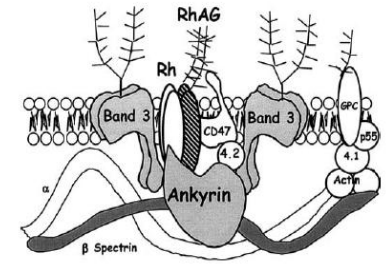
CDE/CDE

CDe/ CDe

---

## 8 aplotipi CDE CdE cDE cdE CDe Cde cde cDe

---



### formano differenti genotipi

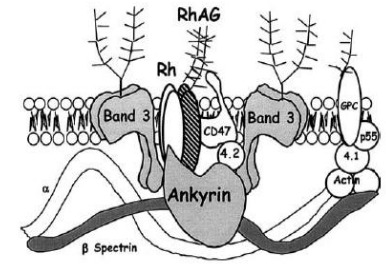
CDE/CDE

CdE/CdE

CDe/ CDe

---

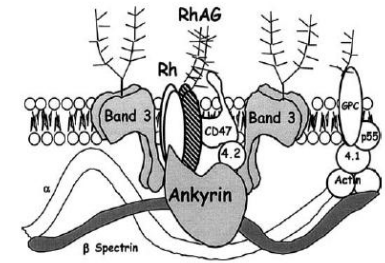
## 8 aplotipi CDE CdE cDE cdE CDe Cde cde cDe



### formano 36 differenti genotipi

CDE/CDE	CdE/CdE	cDE/ cDE	cdE/ cdE
CDe/ CDe	CDE/CdE	CdE/cDE	cDE/cdE
cdE/CDe	CDe/Cde	CDE/cDE	CdE/cdE
cDE/CDe	cdE/Cde	CDe/cde	CDE/cdE
CdE/CDe	cDE/Cde	cdE/cde	CDe/cDe
CDE/CDe	CdE/Cde	cDE/cde	cdE/cDe
CDE/Cde	CdE/cde	cDE/cDe	CDE/cde
CdE/cDe	CDE/cDe	Cde/Cde	cde/cde
cDe/cDe	Cde/cde	cde/cDe	Cde/cDe

## 8 plotipi CDE CdE cDE cdE CDe Cde cde cDe



formano 36 differenti genotipi

CDE/CDE

CDe/CDe

cdE/CDe

CdE/CdE

CDE/CdE

CDe/Cde

cDE/cDE

CdE/cDE

CDE/cDE

cdE/cdE

cDE/cdE

CdE/cdE

cDE/CDe

CdE/CDe

CDE/CDe

CDE/Cde

CdE/cDe

cDe/cDe

cdE/Cde

cDE/Cde

CdE/Cde

CdE/cde

CDE/cDe

Cde/cde

CDe/cde

cdE/cde

cDE/cde

cDE/cDe

Cde/Cde

cde/cDe

CDE/cdE

CDe/cDe

cdE/cDe

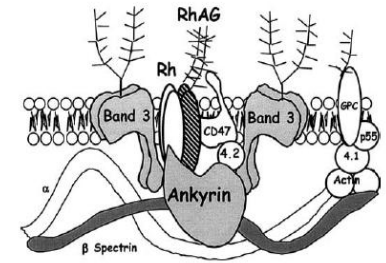
CDE/cde

cde/cde

Cde/cDe



## 8 plotipi CDE CdE cDE cdE CDe Cde cde cDe



formano 36 differenti genotipi

CDE/CDE

CDe/CDe

cdE/CDe

cDE/CDe

CdE/CDe

CDE/CDe

CDE/Cde

CdE/cDe

cDe/cDe

CdE/CdE

CDE/CdE

CDe/Cde

cdE/Cde

cDE/Cde

CdE/Cde

CdE/cde

CDE/cDe

Cde/cde

cDE/cDE

CdE/cDE

CDE/cDE

CDe/cde

cdE/cde

cDE/cde

cDE/cDe

Cde/Cde

cde/cDe

cdE/cdE

cDE/cdE

CdE/cdE

CDE/cdE

CDe/cDe

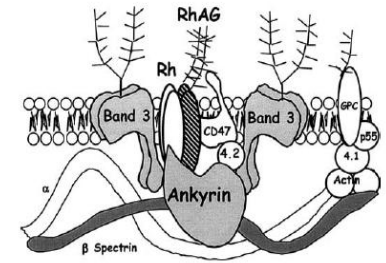
cdE/cDe

CDE/cde

cde/cde

Cde/cDe

## 8 plotipi CDE CdE cDE cdE CDe Cde cde cDe



formano 36 differenti genotipi

CDE/CDE

CDe/CDe

cdE/CDe

cDE/CDe

CdE/CDe

CDE/Cde

CDE/Cde

CdE/cDe

cDe/cDe

CdE/CdE

CDE/CdE

CDe/Cde

cdE/Cde

cDE/Cde

CdE/Cde

CdE/cde

CDE/cDe

Cde/cde

cDE/cDE

CdE/cDE

CDE/cDE

CDe/cde

cdE/cde

cDE/cde

cDE/cDe

Cde/Cde

cde/cDe

cdE/cdE

cDE/cdE

CdE/cdE

CDE/cdE

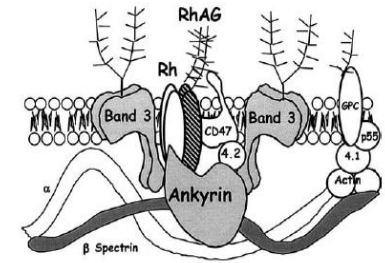
CDe/cDe

cdE/cDe

CDE/cde

cde/cde

Cde/cDe



In realtà solo 18 differenti fenotipi possono essere riconosciuti sierologicamente poiché l'omozigosi D/D non può essere distinta sierologicamente dall'eterozigosi D/d

Genotipo

CDE/CDE

CDE/CdE

CDE/cDE

CDE/cdE

CDE/CDe

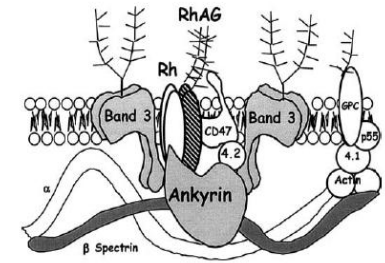
CDE/Cde

Fenotipo

CCDEE

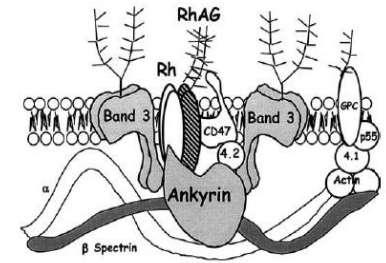
CcDEE

CCdEe



In realtà solo 18 differenti fenotipi possono essere riconosciuti sierologicamente poiché l'omozigosi D/D non può essere distinta sierologicamente dall'eterozigosi D/d

CDE/CDE	CdE/CdE	cDE/ cDE	cdE/ cdE	CDe/ CDe
CDE/CdE	CdE/cDE	cDE/cdE	cdE/CDe	CDe/Cde
CDE/cDE	CdE/cdE	cDE/CDe	cdE/Cde	CDe/cde
CDE/cdE	CdE/CDe	cDE/Cde	cdE/cde	CDe/cDe
CDE/CDe	CdE/Cde	cDE/cde	cdE/cDe	
CDE/Cde	CdE/cde	cDE/cDe		
CDE/cde	CdE/cDe			
CDE/cDe				
		Cde/Cde	cde/cde	cDe/cDe
		Cde/cde	cde/cDe	
		Cde/cDe		



---

Nei donatori Inglesi C e c hanno una frequenza rispettivamente del 68% e 81%.

Nei negri Africani la frequenza di c è molto superiore e quella di C molto inferiore.

Al contrario nell'Est Asiatico C è molto più frequente di c.

In tutte le popolazioni e è significativamente più comune di E.



---

## **La determinazione in laboratorio**

La tipizzazione degli antigeni Rh in laboratorio avviene utilizzando reagenti o antisieri commerciali.

---

Nella pratica clinica, sono facilmente reperibili cinque reattivi per la tipizzazione Rh:

- anti-D
- anti-C
- anti-E
- anti-c
- anti-e

Determinazione dei probabili fenotipi Rh risultanti dai test eseguiti con i cinque principali reagenti fra le tipizzazioni del sistema Rh

---

Anti-D	Anti-C	Anti-E	Anti-c	Anti-e	Antigeni presenti



## Determinazione del tipo RhD in laboratorio

---

- Vetrino *reagenti adatti sono i sieri policlonali ad alto contenuto proteico o quelli monoclonali a basso contenuto proteico*
- Provetta *reagenti adatti sono i sieri policlonali ad alto contenuto proteico o quelli monoclonali a basso contenuto proteico*
- Micropiastra *reagenti esclusivamente sieri anti-D approvati per test in micropiastra*
- Microcolonna *reagenti esclusivamente sieri anti-D approvati per il test*

Determinazione dei probabili fenotipi Rh risultanti dai test eseguiti con i cinque principali reagenti fra le tipizzazioni del sistema Rh

---

Anti-D	Anti-C	Anti-E	Anti-c	Anti-e	Antigeni presenti
+	+	-	+	+	

Determinazione dei probabili fenotipi Rh risultanti dai test eseguiti con i cinque principali reagenti fra le tipizzazioni del sistema Rh

---

Anti-D	Anti-C	Anti-E	Anti-c	Anti-e	Antigeni presenti
+	+	-	+	+	D,C,c,e

Determinazione dei probabili fenotipi Rh risultanti dai test eseguiti con i cinque principali reagenti fra le tipizzazioni del sistema Rh

Anti-D	Anti-C	Anti-E	Anti-c	Anti-e	Antigeni presenti
+	+	-	+	+	D,C,c,e

**Fenotipo Rh: CcDee**

Determinazione dei probabili fenotipi Rh risultanti dai test eseguiti con i cinque principali reagenti fra le tipizzazioni del sistema Rh

---

Anti-D	Anti-C	Anti-E	Anti-c	Anti-e	Antigeni presenti
+	+	-	+	+	D,C,c,e
-	-	-	+	+	

Determinazione dei probabili fenotipi Rh risultanti dai test eseguiti con i cinque principali reagenti fra le tipizzazioni del sistema Rh

Anti-D	Anti-C	Anti-E	Anti-c	Anti-e	Antigeni presenti
+	+	-	+	+	D,C,c,e
-	-	-	+	+	-,c,e,

**Fenotipo Rh: ccddee**

Determinazione dei probabili fenotipi Rh risultanti dai test eseguiti con i cinque principali reagenti fra le tipizzazioni del sistema Rh

**Reattivi**

	<b>Anri-D</b>	<b>Anti-C</b>	<b>Anti-E</b>	<b>Anti-c</b>	<b>Anti-e</b>	<b>Antigeni presenti</b>
	+	+	0	+	+	D, C, c, e
	+	+	0	0	+	D, C, e
	+	+	+	+	+	D, C, c, E, e
	+	0	0	+	+	D, c, e
	+	0	+	+	+	D, c, E, e
	+	0	+	+	0	D, c, E
	+	+	+	0	+	D, C, E, e
	+	+	+	+	0	D, C, c, E
	+	+	+	0	0	D, C, E
	0	0	0	+	+	c, e
	0	+	0	+	+	C, c, e
	0	0	+	+	+	c, E, e
	0	+	+	+	+	C, c, E, e

*(AABB: Technical Manual)*

## Rappresentazione schematica del locus RH

Centromero



Telomero



■ Fenotipo Rh-pos

RHCE

RHD

■ Fenotipo Rh-neg

RHCE

La maggior parte delle persone D negative sono omozigoti per l'allele *RHce*, il gene che codifica per gli antigeni c ed e;

meno frequentemente possono presentare gli alleli *RHCe* o *RHcE* che codificano rispettivamente per C ed e oppure per c ed E.



---

La maggioranza delle emazie D positive presentano, con un siero anti-D dopo centrifugazione, una netta agglutinazione macroscopica, che ne consente la rapida classificazione come D positive, in presenza di un risultato negativo del controllo.

---

Per alcuni campioni di globuli rossi, la dimostrazione della presenza del D richiede l'incubazione con il reattivo diagnostico, e successiva aggiunta del siero antiglobuline umane (AHG) [test dell'antiglobulina indiretto (TAI)].

La corretta attribuzione del fenotipo di queste emazie (un tempo classificate D<sup>u</sup>) richiede una fase addizionale dell'esame.

---

# **Gli anticorpi ed il loro significato clinico**

---

Nel campo della medicina trasfusionale, D è l'antigene più importante dopo gli antigeni A e B.

L'anti-D può determinare reazioni emolitiche trasfusionali severe e fatali e malattia emolitica del neonato.

---

È possibile ritrovare dopo 2-5 mesi un anticorpo con specificità anti-D nel **85%** di soggetti D-negativi trasfusi con almeno 200 ml di eritrociti D-positivi.

Circa la metà del restante 15% non produrranno l'anticorpo nemmeno dopo ulteriori stimolazioni.

Questi soggetti sono definiti “*non responders*”

(Mollison P.L.)

---

Tutti gli anticorpi del sistema Rh possono potenzialmente causare reazioni emolitiche e MEN.

L'antigene c è clinicamente il più importante antigene Rh dopo il D.

L'anti-C, -E, -e raramente si rendono responsabili di MEN, in tal caso in forma solitamente moderata.

---

La maggior parte degli anticorpi anti-Rh originano dalla esposizione a eritrociti umani per trasfusioni o gravidanze.

Occasionalmente, gli anticorpi anti-Rh possono essere naturali (per esempio anti-E, anti-Cw).

Gli anticorpi anti-Rh permangono, di solito, per molti anni.

Se il loro livello sierico scende al di sotto di quello rilevabile, l'eventuale successiva esposizione all'antigene produce, tipicamente, una risposta immune secondaria.

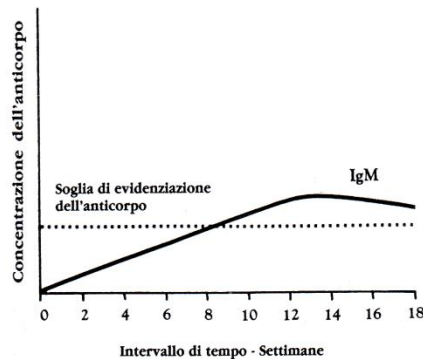


Figura 1.3A Grafico del tempo di una risposta immune primaria, che segue il contatto con l'antigene (Nota: la scala temporale è espressa in settimane, diversamente dalla Fig. 1.3B).

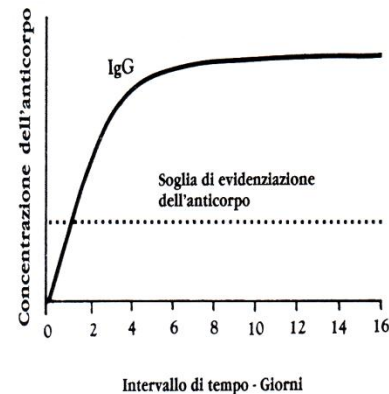


Figura 1.3B Grafico del tempo di una risposta secondaria seguente al secondo o a successivi contatti con lo stesso antigene (Nota: la scala temporale è espressa in giorni diversamente dalla figura 1.3A)



La maggior parte degli anticorpi anti-D sono di classe IgG, solitamente IgG1 e IgG3.

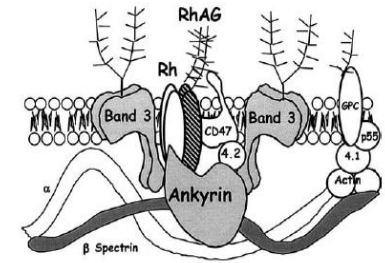
---

Salvo eccezioni estremamente rare, gli anticorpi anti-Rh non fissano il complemento.

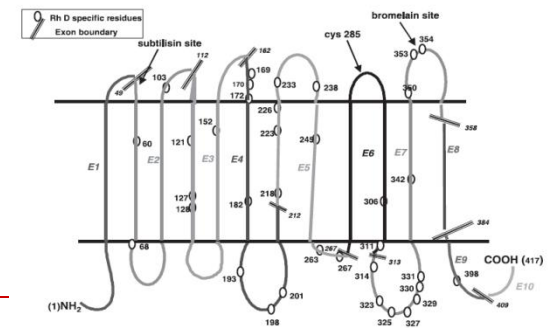
Per questo motivo, nelle reazioni trasfusionali che coinvolgono anticorpi anti-Rh, si determina soprattutto un'emolisi di tipo extravascolare.

---

## **Le varianti RhD**

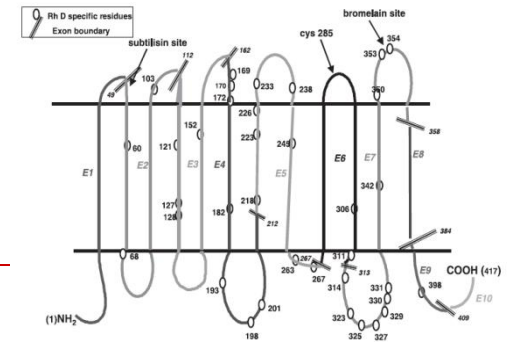


Nella razza bianca lo 0,2-1% degli individui presenta una diminuita e/o alterata espressione della proteina RhD tale da determinare le “varianti” dell’antigene RhD.



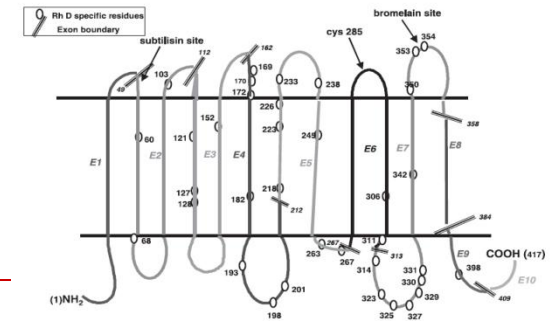
Nel 1946 è stata identificata una variante quantitativa dell'antigene D debolmente espressa; questa variante è stata chiamata **D<sup>u</sup>**.

Questa variante, ora chiamata “**weak D**”, è di notevole importanza clinica e diagnostica.



Dal 1953 è apparso chiaro che esistono anche varianti qualitative dell'antigene D.

Sebbene i pazienti con questo **D parziale variant** siano positivi per l'antigene D, possono formare un anti-D.

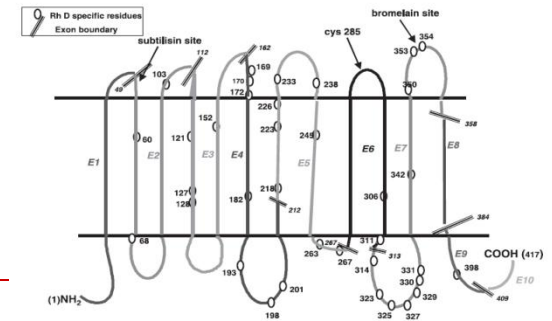


## Weak D

L'antigene D è espresso ma debolmente (alterazioni quantitative)

Sono presenti alterazione qualitative in zone "non critiche" della molecola (loops intracellulari)

## “weak D”



L'intero antigene D è espresso, ma debolmente.

Poiché sono presenti tutti gli epitopi D, i soggetti con weak D non producono anti-D se immunizzati con un antigene D normale, completo.

Il weak D è solitamente associato con sostituzioni aminoacidiche in porzioni non esposte all'esterno della membrana.

## “weak D”

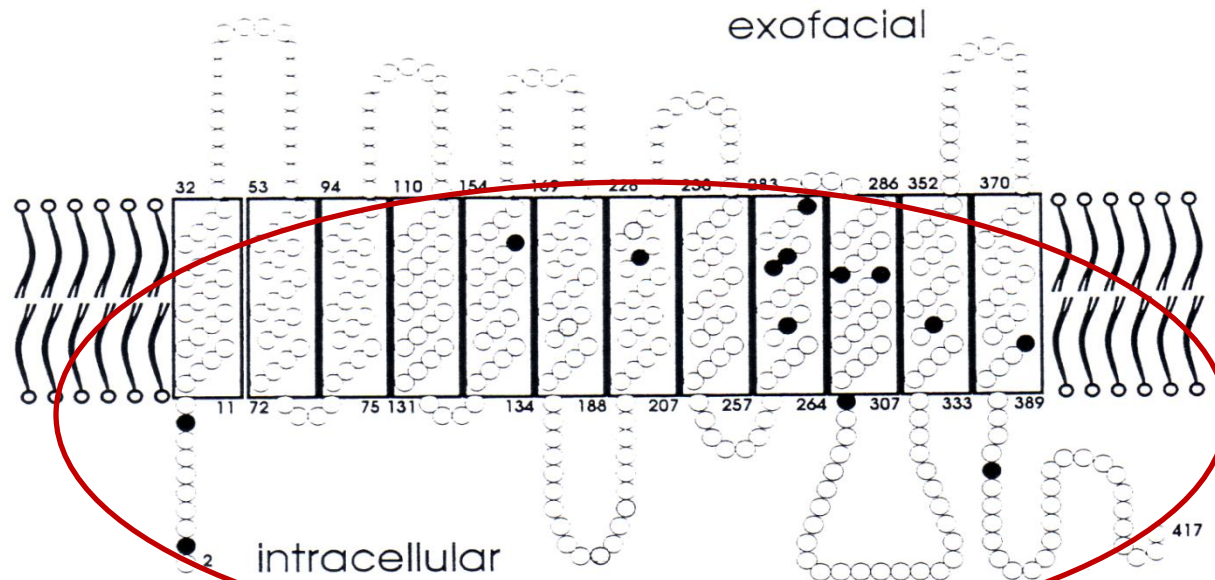
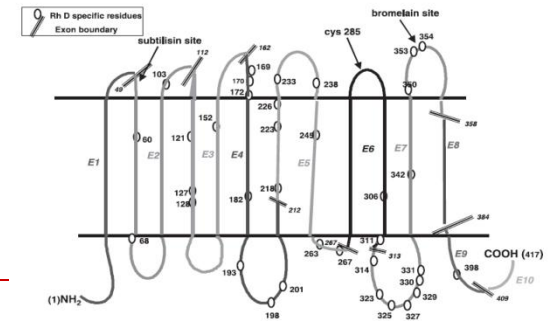


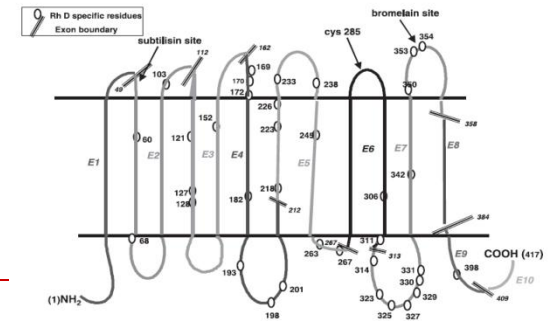
Fig 3. Localization of the amino acid substitutions of the weak D types. A predicted topology of the RhD protein with respect to the plane of the red blood cells' membrane is presented. Amino acid substitutions are shown for single events (black circles) and multiple events (gray circles). The amino acid substitutions of all weak D types were located in intracellular and transmembrane protein segments.





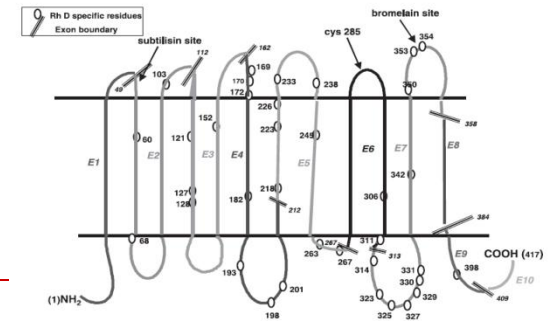
## “partial D”

RhD caratterizzato da una alterazione qualitativa della molecola nella sua porzione extramembranaria, dovuta alla formazione di alleli ibridi RHD/RHCE o da mutazioni missense.



## Partial D

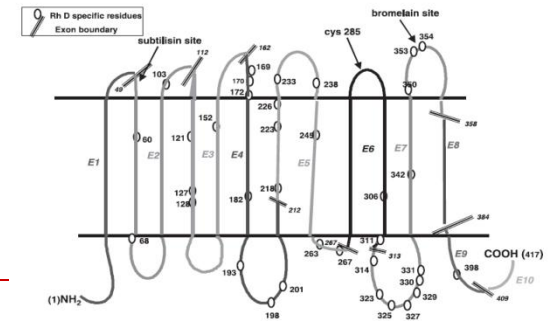
Sono presenti alterazioni qualitative in zone “critiche”  
(loops extracellulari)



## Partial D

Sono presenti alterazioni qualitative in zone “critiche”  
(loops extracellulari)

Mancano alcuni epitopi, è pertanto possibile la  
produzione di anticorpi rivolti verso gli epitopi mancanti



## Partial D

Sono presenti alterazioni qualitative in zone “critiche”  
(loops extracellulari)

Mancano alcuni epitopi, è pertanto possibile la produzione  
di anticorpi rivolti verso gli epitopi mancanti

**L’anticorpo nei test si comporta come un comune anti-D.**

---

## Partial D

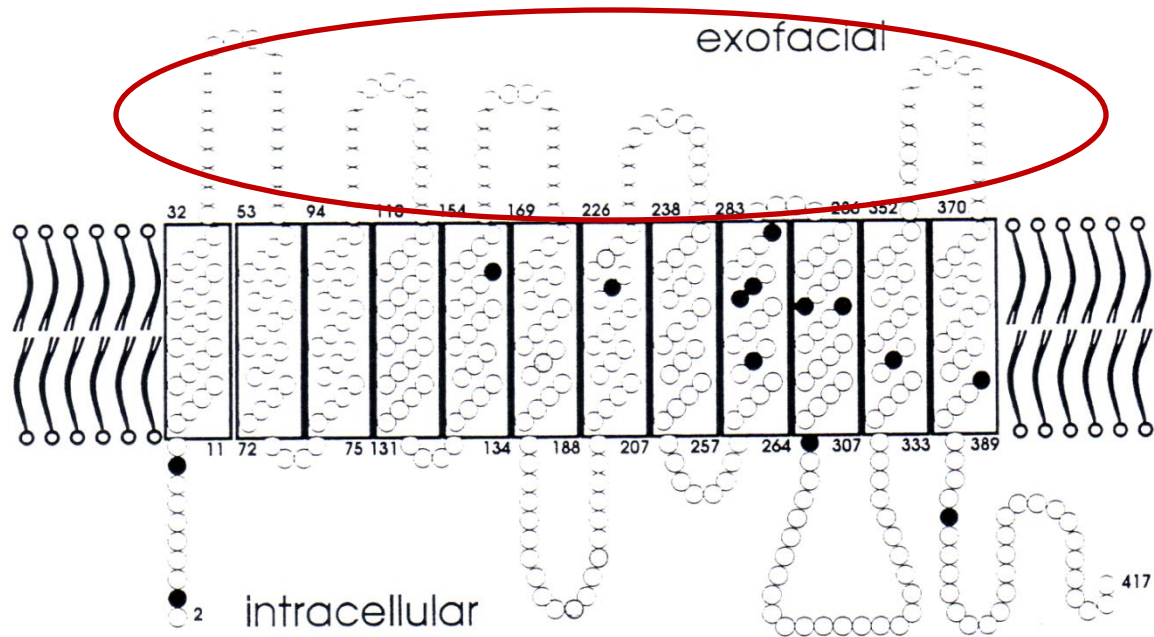
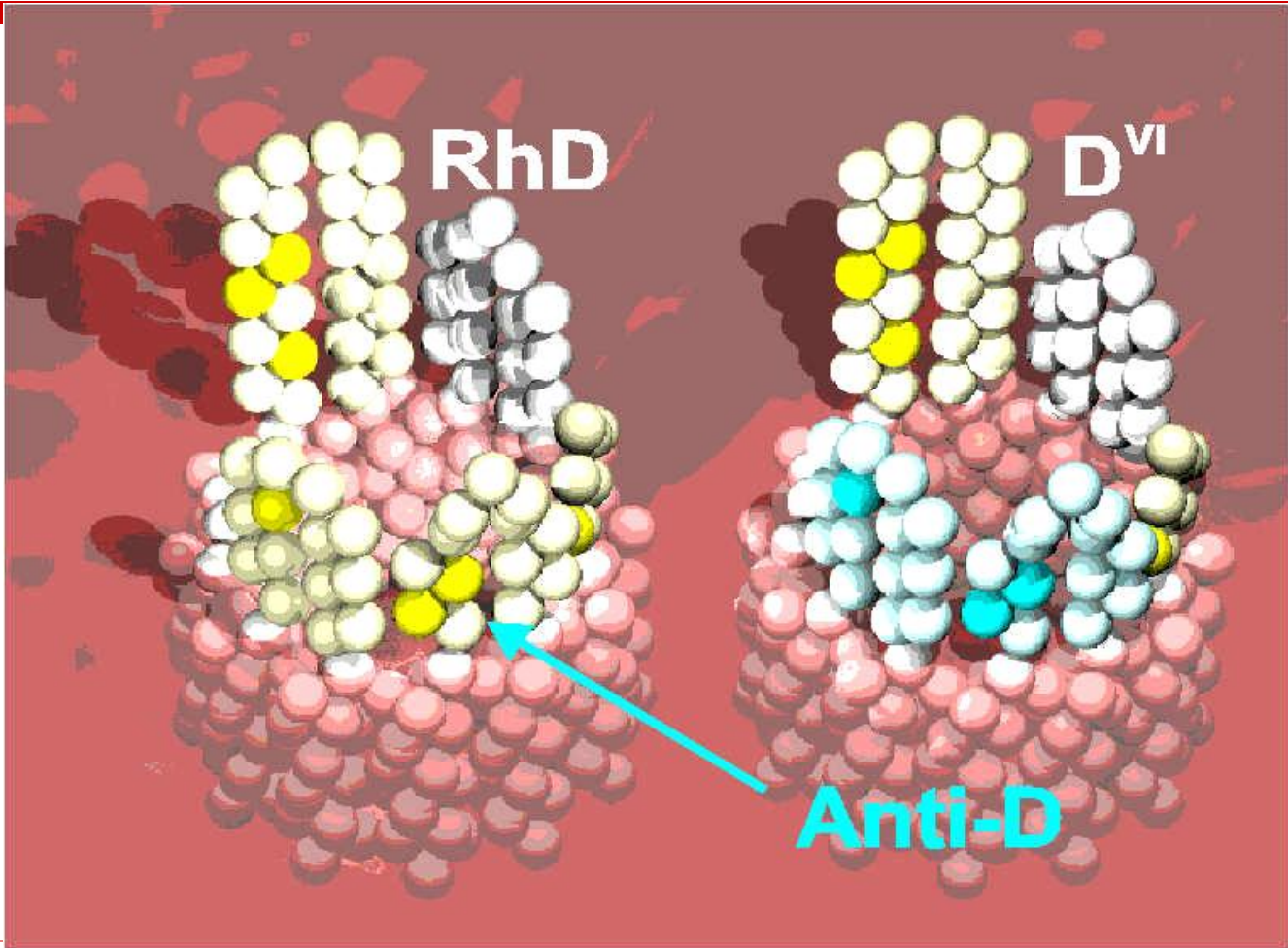
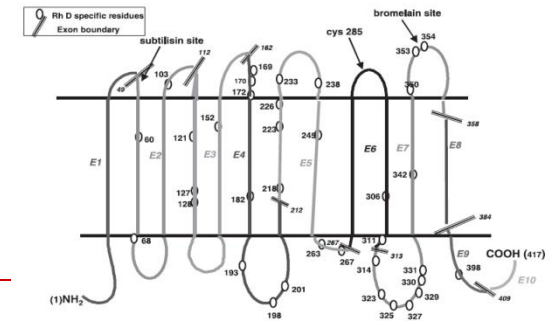
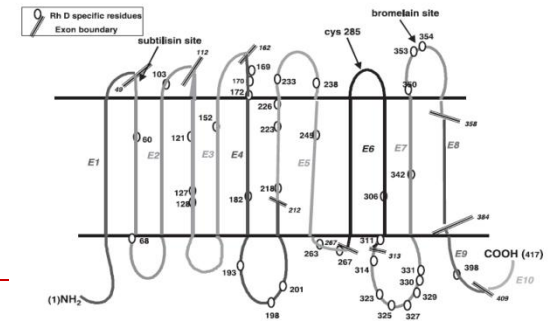


Fig 3. Localization of the amino acid substitutions of the weak D types. A predicted topology of the RHD protein with respect to the plane of the red blood cells' membrane is presented. Amino acid substitutions are shown for single events (black circles) and multiple events (gray circles). The amino acid substitutions of all weak D types were located in intracellular and transmembraneous protein segments.





Queste varianti possono essere difficilmente determinabili con la sola metodica sierologica routinaria.



Gli studi molecolari hanno chiarito il meccanismo genetico che da luogo a molti fenotipi D parziali, evidenziando che i fenotipi si formano o come il risultato di scambi di materiale genico tra il gene *RHCE* e il gene *RHD* oppure prendono origine da singole mutazioni puntiformi.



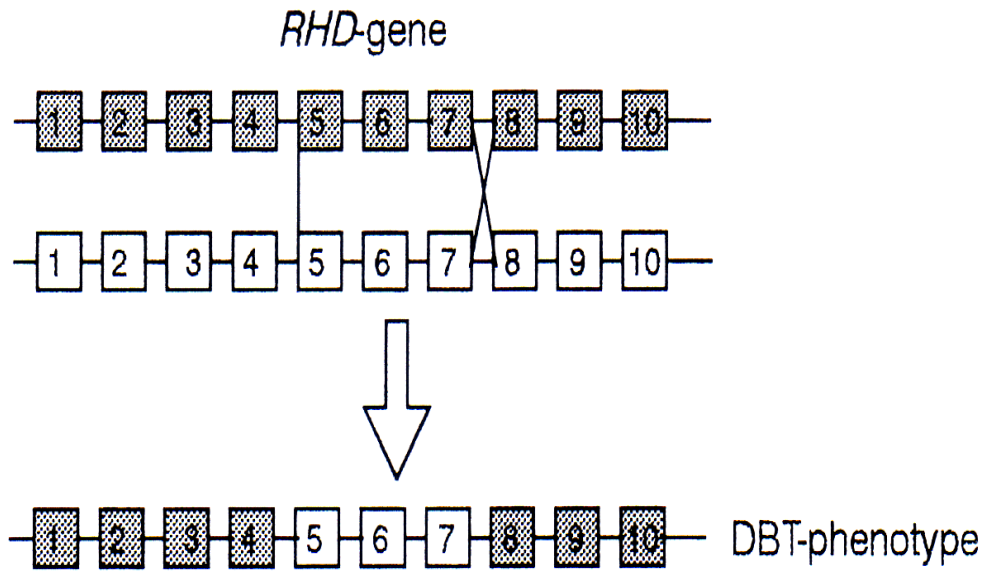


Fig 5. Crossing-over event leading to the DBT phenotype. The DBT phenotype results from a hybrid *RHD* gene after double unequal crossing-over between the two homologous *RH* genes. In the figure DNA exchange of exons 5, 6 and 7 are depicted. As indicated in the text, exon 8 is identical in both genes and may also be involved.

© 1996 Blackwell Science Ltd, *British Journal of Haematology* 93: 720-727

Esistono numerose varianti dell'antigene D.  
Perlopiù causate da una mutazione nel gene  
RHD.

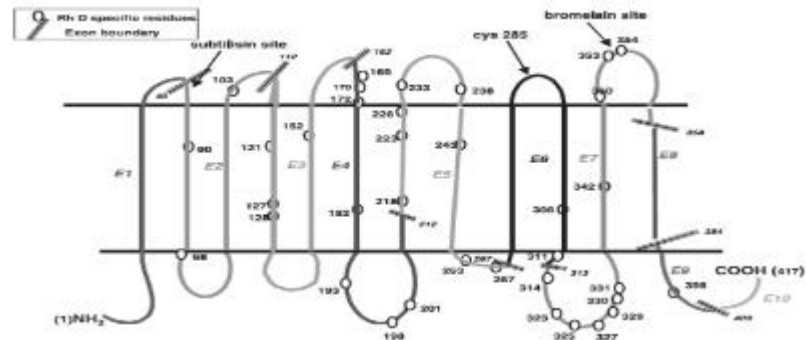
---

Le varianti RHD sono state classificate in  
due categorie principali.

## Weak D

L'antigene D è espresso per intero ma in maniera debole.

Sono presenti tutti gli epitopi di D.



## Weak D

Di conseguenza l'antigene D "normale" non è solitamente immunogeno per i portatori di weak D.

---

### Eccezioni:

Weak D di tipo 15

Weak D di tipo 4.2 (DAR)

Weak D di tipo 7

Weak D di tipo 11

I genotipi weak D sono stati numerati da weak D type 1 a weak D type 76.

## **Weak D**

I weak D tipo 1, 2, 3, 4.0/4.1 sono i più comuni nella popolazione europea e caucasica e rappresentano il 95% dei weak D totali.

---

Ad oggi, in questi tipi di weak D non è mai stata documentata una alloimmunizzazione anti-D.

Questa osservazione è di particolare importanza nella prevenzione e management dell'alloimmunizzazione anti-D in gravidanza.

## **Weak D**

---

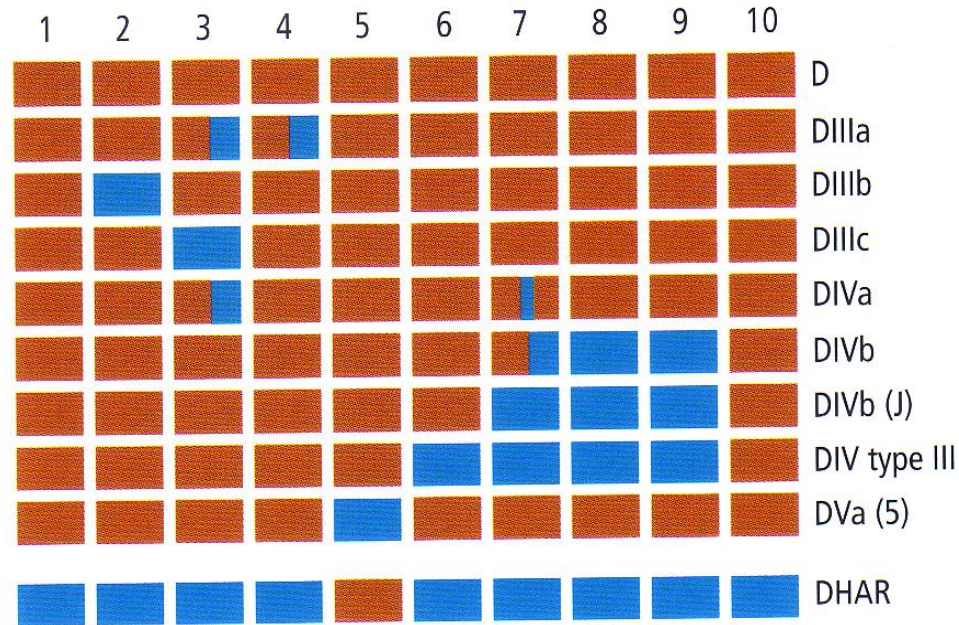
Donne in gravidanza con weak D (da 1 a 4.1) possono essere trasfuse con eritrociti D-positivo e non vi è indicazione alla immunoprofilassi anti-D.

## **Partial D**

Il D parziale è solitamente determinato da sostituzioni aminoacidiche nei *loop* extracellulari della proteina RhD.

---

Poiché alcuni o molti epitopi D sono mancanti gli individui con partial D possono produrre un anticorpo diretto verso gli epitopi mancanti.



**Fig. 4.2** Diagram of the 10 exons of nine examples of *RHD-CE-D* and one *RHCE-D-CE* (DHAR) genes responsible for D variant phenotypes. Red boxes = *RHD* exons; blue boxes = *RHCE* exons.



Nonostante gli sforzi compiuti negli ultimi 50 anni, l'alloimmunizzazione anti-D si verifica ancora in 1:2000 gravidanze D-negative.

---

Possibili cause sono:

*Mancaza di appropriata profilassi*

*Inappropriata somministrazione della profilassi*

*Pre-alloimmunizzazione*

*Passaggio transplacentare precoce di cellule fetali*

*Trasfusione di eritrociti DEL-positivi*





---

## **La determinazione in laboratorio**

La tipizzazione degli antigeni Rh in laboratorio avviene utilizzando reagenti o antisieri commerciali.

---

Nella pratica clinica, sono facilmente reperibili cinque reattivi per la tipizzazione Rh:

anti-D  
anti-C  
anti-E  
anti-c  
anti-e

Determinazione dei probabili fenotipi Rh risultanti dai test eseguiti con i cinque principali reagenti fra le tipizzazioni del sistema Rh

**Reattivi**

	<b>Anri-D</b>	<b>Anti-C</b>	<b>Anti-E</b>	<b>Anti-c</b>	<b>Anti-e</b>	<b>Antigeni presenti</b>
	+	+	0	+	+	D, C, c, e
	+	+	0	0	+	D, C, e
	+	+	+	+	+	D, C, c, E, e
	+	0	0	+	+	D, c, e
	+	0	+	+	+	D, c, E, e
	+	0	+	+	0	D, c, E
	+	+	+	0	+	D, C, E, e
	+	+	+	+	0	D, C, c, E
	+	+	+	0	0	D, C, E
	0	0	0	+	+	c, e
	0	+	0	+	+	C, c, e
	0	0	+	+	+	c, E, e
	0	+	+	+	+	C, c, E, e

*(AABB: Technical Manual)*

---

La maggioranza delle emazie D positive presentano, con un siero anti-D dopo centrifugazione, una netta agglutinazione macroscopica, che ne consente la rapida classificazione come D positive, in presenza di un risultato negativo del controllo.

---

Per alcuni campioni di globuli rossi, la dimostrazione della presenza del D richiede l'incubazione con il reattivo diagnostico, e successiva aggiunta del siero antiglobuline umane (AHG) [test dell'antiglobulina indiretto (TAI)].

La corretta attribuzione del fenotipo di queste emazie (un tempo classificate D<sup>u</sup>) richiede una fase addizionale dell'esame.

---

Fino a poco tempo fa, nella maggioranza degli esami si utilizzavano reagenti anti-D policlonali di origine umana.

In tempi più recenti, sono diventati ampiamente disponibili reattivi monoclonali anti-D.



---

I reattivi monoclonali anti-D sono prevalentemente costituiti da anticorpi umani di classe IgM che agglutinano efficacemente la maggior parte delle emazie D-positive.

I reattivi monoclonali solitamente producono reazioni più forti di quelle ottenute con i reattivi policlonali di classe IgG, ma possono occasionalmente fallire l'agglutinazione delle emazie dei soggetti appartenenti ad alcune categorie di D parziali.

---

Aggiungendo delle piccole aliquote di anticorpi IgG ai monoclonali di classe IgM si produce una miscela di anticorpi che reagiranno con gli antigeni D deboli o con D parziali nel test all'antiglobulina.

## Determinazione del tipo RhD in laboratorio

---

- Vetrino *reagenti adatti sono i sieri policlonali ad alto contenuto proteico o quelli monoclonali a basso contenuto proteico*
- Provetta *reagenti adatti sono i sieri policlonali ad alto contenuto proteico o quelli monoclonali a basso contenuto proteico*
- Micropiastra *reagenti esclusivamente sieri anti-D approvati per test in micropiastra*
- Microcolonna *reagenti esclusivamente sieri anti-D approvati per il test*

Negli anni '60 la categoria **D<sup>VI</sup>** è stata identificata come quella più a rischio di alloimmunizzazione in pazienti etichettati come D-positivi.

---

Per tale motivo è stato stabilito successivamente di considerare i D<sup>VI</sup> come D-negativi negli europei.

Negli anni '80 sono stati messi a punto reagenti monoclonali anti-D che consentono la distinzione tra D<sup>VI</sup> e D-positivi.

---

Dal 1995 i reagenti monoclonali anti-D che non identificano i D<sup>VI</sup> sono entrati nell'uso routinario.

Grazie a questa strategia i pazienti D<sup>VI</sup> e le donne in gravidanza sono tipizzati "falsi negativi" evitando così trasfusioni D-positivo e prevenendo l'alloimmunizzazione anti-D.



## **E. 3.2 Determinazione del gruppo ABO e tipo RhD: donatori**

---

**E.3.2.2 Per i donatori che non risultano precedentemente tipizzati per i sistemi gruppo ematici ABO, RhD e Kell:**

- **la determinazione del tipo RhD viene effettuata utilizzando 2 diversi reagenti anti-D di comprovata sensibilità (se entrambi monoclonali, derivanti da cloni diversi);**
- **in caso di RhD negativo, viene eseguita la ricerca del D *weak*.**



## *Guida per l'applicazione*

Il controllo del tipo RhD **deve** essere eseguito mediante l'utilizzo di un reagente anti-D di comprovata sensibilità, in grado di rilevare la variante D<sup>VI</sup>.

La determinazione del tipo RhD **deve** essere effettuata utilizzando 2 diversi reagenti anti-D di comprovata sensibilità (se entrambi monoclonali, derivanti da cloni diversi), di cui almeno uno **dovrebbe** rilevare la variante D<sup>VI</sup>, al fine di evitare l'erronea attribuzione del tipo RhD negativo a donatori portatori della variante D<sup>VI</sup>.

La ricerca del D weak deve essere effettuata con la metodica dell'antiglobulina indiretta, utilizzando un reattivo anti-D in grado di rilevare anche la variant D<sup>VI</sup>.

Nel caso in cui la ricerca del D weak, effettuata con la metodica dell'antiglobulina indiretta, risulti positiva, deve essere sistematicamente verificata in parallelo la negatività del test diretto all'antiglobulina.



## Standard di Medicina Trasfusionale

Si raccomanda di adottare i seguenti criteri di attribuzione del tipo RhD:

a) positività con entrambi i 2 reagenti anti-D: *RhD positivo*

b) negatività con entrambi i 2 reagenti anti-D e negatività della ricerca del D *weak*:  
*RhD negativo*

---

c) negatività con entrambi i 2 reagenti anti-D e positività della ricerca del D *weak*:  
*RhD positivo*

d) positività con un solo anti-D e negatività/positività della ricerca del D *weak*:  
attribuzione "cautelativa" del tipo *RhD positivo*.

In questi casi **si raccomanda** di approfondire l'incongruenza rilevata, eventualmente effettuando anche la ricerca sierologica dei D *variant* con altri cloni anti-D o *kit* estesi di sieri monoclonali anti-epitopi e/o determinando il tipo RhD mediante metodiche di tipizzazione genomica, se necessario ricorrendo ad un laboratorio di immunoematologia di riferimento

e) accertamento di D *variant*: *RhD positivo*

(in tali casi **si raccomanda** di esplicitare chiaramente la particolarità fenotipica al donatore nel referto)





## Standard di Medicina Trasfusionale

---

Per le ricerche dei D *variant* e del D *weak*, può risultare utile l'adozione di specifici *kit* che utilizzano miscele di anticorpi monoclonali di classe IgG e IgM diretti contro i diversi epitopi dell'antigene D, e che consentono di identificare la maggior parte dei D *variant* conosciuti e di confermare il D *weak*.

L'attribuzione di un fenotipo D *variant* con metodiche sierologiche **deve** essere confermata in biologia molecolare.



---

## **E. 3.3 Determinazione del gruppo ABO e tipo RhD: pazienti**

### **E.3.3.2 Per i pazienti che non risultano tipizzati presso la ST**

**-la determinazione del tipo RhD viene effettuata utilizzando 2 diversi reagenti anti-D di comprovata sensibilità (se entrambi monoclonali, derivanti da cloni diversi);**



# Standard di Medicina Trasfusionale

## *Guida per l'applicazione*

Il controllo del tipo RhD **deve** essere eseguito mediante l'utilizzo di un reagente anti-D di comprovata sensibilità che, preferibilmente, non rilevi la variante D<sup>VI</sup>.

---

La determinazione del tipo RhD **deve** essere effettuata utilizzando 2 diversi reagenti anti-D di comprovata sensibilità (se entrambi monoclonali, derivanti da cloni diversi), di cui almeno uno **non deve** rilevare la variante D<sup>VI</sup>, al fine di evitare l'attribuzione del tipo RhD positivo ai pazienti portatori della variante D<sup>VI</sup> che, se trasfusi con globuli rossi RhD positivi, possono sviluppare una immunizzazione anti-D.

Ai fini della profilassi della malattia emolitica del neonato, nei neonati RhD negativi, **deve** essere effettuata la ricerca del D weak con la metodica della antiglobulina indiretta, utilizzando un reattivo anti-D in grado di rilevare anche la variante parziale D<sup>VI</sup>.

Nel caso in cui la ricerca del D weak, effettuata con la metodica dell'antiglobulina indiretta, risulti positiva, deve essere sistematicamente verificata in parallelo la negatività del test diretto all'antiglobulina.



## Standard di Medicina Trasfusionale

Si raccomanda, inoltre, di adottare i seguenti criteri di attribuzione del tipo RhD:

- a) positività con entrambi i 2 reagenti anti-D: *RhD positivo*
- b) negatività con entrambi i 2 reagenti anti-D: *RhD negativo*
- c) ~~negatività con entrambi i 2 reagenti anti-D e negatività della ricerca del D *weak* (ove effettuata): *RhD negativo*~~
- d) negatività con entrambi i 2 reagenti anti-D e positività della ricerca del D *weak* (ove effettuata): *D weak* (in tali casi, **si raccomanda** di esplicitare chiaramente nel referto la particolarità fenotipica ai fini della trasfusione)
- e) positività con un solo anti-D e negatività/positività della ricerca del D *weak* (ove effettuata): attribuzione "cautelativa" del tipo *RhD negativo*;  
in questi casi **si raccomanda** di approfondire l'incongruenza, effettuando anche la ricerca dei D *variant* e/o determinando il tipo RhD mediante tecniche di tipizzazione genomica, se necessario ricorrendo ad un laboratorio di immunematologia eritrocitaria di riferimento
- f) accertamento di D *variant*: *RhD negativo*  
(in tali casi **si raccomanda** di esplicitare chiaramente nel referto la particolarità fenotipica ai fini della trasfusione)



## Standard di Medicina Trasfusionale

---

Per le ricerche dei D *variant* e del D *weak*, può risultare utile l'adozione di specifici *kit* che utilizzano miscele di anticorpi monoclonali di classe IgG e IgM diretti contro i diversi epitopi dell'antigene D, e che consentono di identificare la maggior parte dei D *variant* conosciuti e di confermare il D *weak*.

La attribuzione di un fenotipo D *variant* con metodiche sierologiche **deve** essere confermata in biologia molecolare.

Attualmente sono disponibili **tecniche molecolari** che possono determinare direttamente il genotipo Rh.

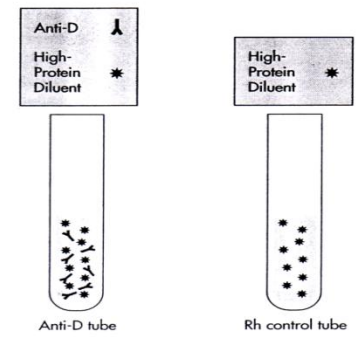
La determinazione del genotipo viene effettuata con la metodologia della *polymerase chain reaction* (PCR) utilizzando il DNA ottenuto dai leucociti.

---

Le attuali conoscenze del background molecolare del polimorfismo del D rendono possibile effettuare test per predire il fenotipo D dal DNA fetale con un alto grado di accuratezza.

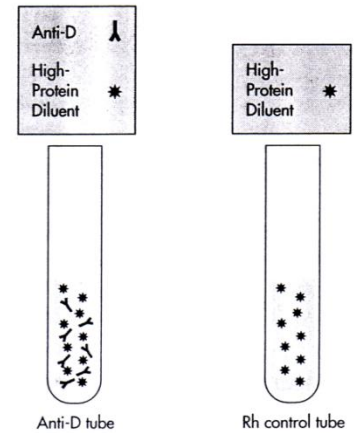
Il DNA fetale può essere isolato dagli amniociti o da campioni di villi corionici.

Un'altra fonte è il DNA fetale extracellulare presente nel plasma materno (*Cell-free fetal DNA; MALDI-TOF MS*)



**Fig. 2-6 Anti-D and Rh control tubes.** The anti-D tube contains anti-D antibodies suspended in the high-protein diluent. The Rh control contains diluent and no anti-D antibodies.

## La determinazione in laboratorio



**Fig. 2-6 Anti-D and Rh control tubes.** The anti-D tube contains anti-D antibodies suspended in the high-protein diluent. The Rh control contains diluent and no anti-D antibodies.

La maggioranza delle emazie D positive presentano, con un siero anti-D dopo centrifugazione, una netta agglutinazione macroscopica, che ne consente la rapida classificazione come D positive

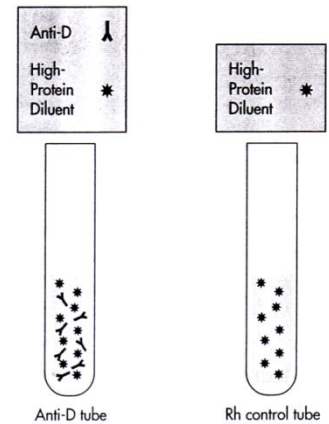




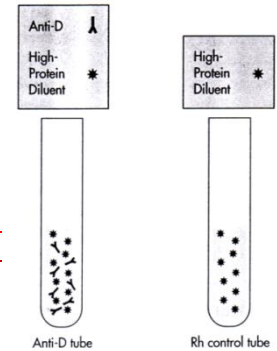
---

Fino a poco tempo fa, nella maggioranza degli esami si utilizzavano reagenti anti-D policlonali di origine umana, in soluzioni iperproteiche, idonei per gli esami su vetrino, in provette o in micropiastre.

In tempi più recenti, sono diventati ampiamente disponibili reattivi monoclonali anti-D.



**Fig. 2-6 Anti-D and Rh control tubes.** The anti-D tube contains anti-D antibodies suspended in the high-protein diluent. The Rh control contains diluent and no anti-D antibodies.

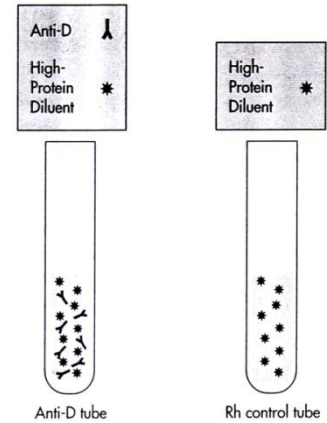


**Fig. 2-6 Anti-D and Rh control tubes.** The anti-D tube contains anti-D antibodies suspended in the high-protein diluent. The Rh control contains diluent and no anti-D antibodies.

Alcuni reattivi anti-D destinati all'uso su vetrino, in provetta o in micropiastra contengono un'elevata concentrazione proteica (20-24%) oltre ad altri additivi macromolecolari.

Questi reattivi sono quasi sempre preparati da pool di sieri umani e producono risultati rapidi e affidabili.

Gli elevati livelli proteici e gli additivi macromolecolari possono determinare reazioni falsamente positive.

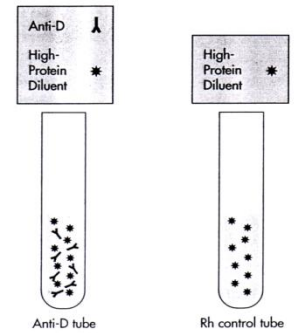


**Fig. 2-6 Anti-D and Rh control tubes.** The anti-D tube contains anti-D antibodies suspended in the high-protein diluent. The Rh control contains diluent and no anti-D antibodies.

Se le emazie presentano un'aggregazione nel test di controllo, i risultati del test con l'anti-D non possono essere considerati attendibili.

## *Risultati fuorvianti con i reagenti iperproteici*

*Falsi positivi.*



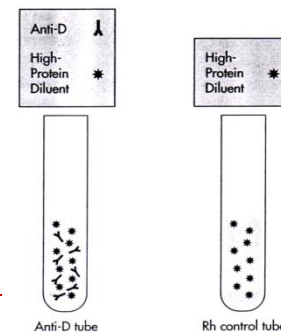
**Fig. 2-6 Anti-D and Rh control tubes.** The anti-D tube contains anti-D antibodies suspended in the high-protein diluent. The Rh control contains diluent and no anti-D antibodies.

L'aggregazione cellulare può essere causata da immunoglobuline adese sugli eritrociti del paziente, oppure i medesimi fattori sierici che provocano la formazione di impilati determinano risultati falsamente positivi sia nell'esame sia nella prova di controllo.

I fattori sierici possono essere eliminati, lavando accuratamente le emazie e ripetendo il test.

## *Risultati fuorvianti con i reagenti iperproteici*

### *Falsi positivi.*

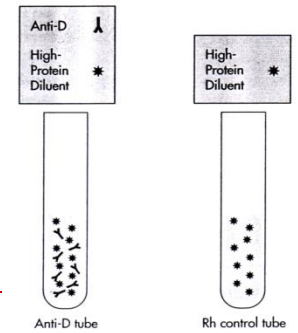


**Fig. 2-6 Anti-D and Rh control tubes.** The anti-D tube contains anti-D antibodies suspended in the high-protein diluent. The Rh control contains diluent and no anti-D antibodies.

Se gli eritrociti nel test di controllo non vengono agglutinati e il test con l'anti-D risulta positivo, le emazie in esame sono D positive.

Se l'agglutinazione si verifica anche nella prova di controllo, la spiegazione più probabile è che vi siano delle immunoglobuline che sensibilizzano le emazie, che devono essere riesaminate con un reattivo a basso contenuto proteico.

## *Risultati fuorvianti con i reagenti iperproteici*



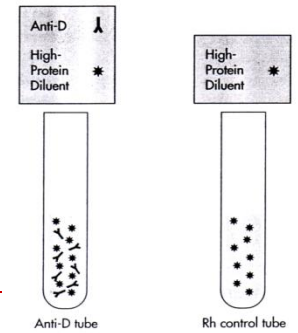
**Fig. 2-6 Anti-D and Rh control tubes.** The anti-D tube contains anti-D antibodies suspended in the high-protein diluent. The Rh control contains diluent and no anti-D antibodies.

### *Falsi positivi.*

L'aggregazione delle emazie che simula un'agglutinazione, può verificarsi anche nel caso di un'incubazione troppo prolungata, che ha determinato un'eccessiva evaporazione durante un test eseguito su vetrino.

## *Risultati fuorvianti con i reagenti iperproteici*

---



**Fig. 2-6 Anti-D and Rh control tubes.** The anti-D tube contains anti-D antibodies suspended in the high-protein diluent. The Rh control contains diluent and no anti-D antibodies.

## *Falsi negativi.*

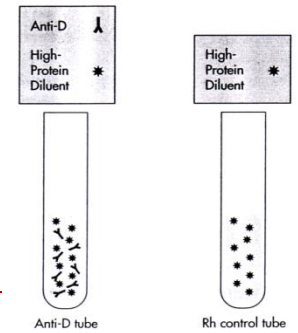
Una sospensione eritrocitaria troppo concentrata nel test in provetta, od una sospensione troppo diluita nel test su vetrino possono indebolire la reazione.

Le emazie sospese in soluzione salina non devono essere usate per i test su vetrino.

---

## *Risultati fuorvianti con i reagenti iperproteici*

*Falsi negativi.*

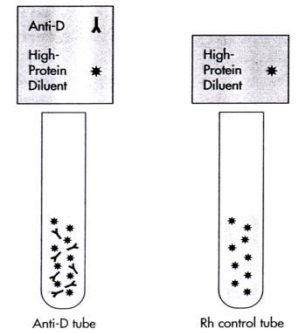


**Fig. 2-6 Anti-D and Rh control tubes.** The anti-D tube contains anti-D antibodies suspended in the high-protein diluent. The Rh control contains diluent and no anti-D antibodies.

I globuli rossi che presentano un'espressione indebolita del D possono non reagire in modo ottimale nel limite dei 2 minuti del test su vetrino o dopo la centrifugazione immediata nel test in provetta.



## *Reagenti a basso contenuto proteico*



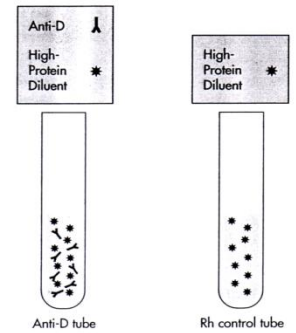
**Fig. 2-6 Anti-D and Rh control tubes.** The anti-D tube contains anti-D antibodies suspended in the high-protein diluent. The Rh control contains diluent and no anti-D antibodies.

I reattivi a basso contenuto proteico vengono comunemente utilizzati e sono prevalentemente formulati per gli anticorpi monoclonali.

I reattivi monoclonali anti-D sono prevalentemente costituiti da anticorpi umani di classe IgM che non necessitano di alcun potenziante e agglutinano efficacemente la maggior parte delle emazie D positive di soggetti adulti o di neonati in un sistema salino.

## *Reagenti a basso contenuto proteico*

---

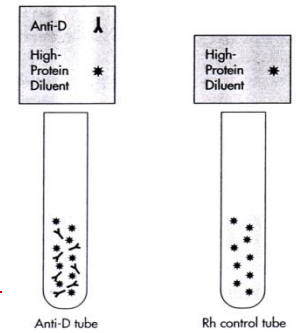


**Fig. 2-6 Anti-D and Rh control tubes.** The anti-D tube contains anti-D antibodies suspended in the high-protein diluent. The Rh control contains diluent and no anti-D antibodies.

I reattivi monoclonali solitamente producono reazioni più forti di quelle ottenute con i reattivi policlonali di classe IgG, ma possono occasionalmente fallire l'agglutinazione delle emazie dei soggetti appartenenti ad alcune categorie di D parziali.

---

## *Reagenti a basso contenuto proteico*

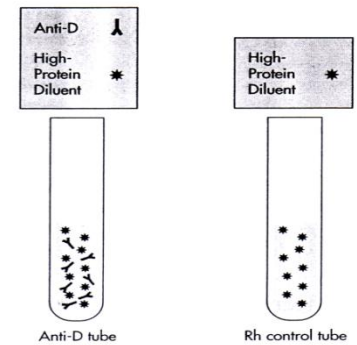


**Fig. 2-6 Anti-D and Rh control tubes.** The anti-D tube contains anti-D antibodies suspended in the high-protein diluent. The Rh control contains diluent and no anti-D antibodies.

La maggior parte dei reattivi monoclonali miscelati hanno una concentrazione proteica totale simile a quella del siero umano.

È raramente necessario allestire un esame di controllo separato. L'assenza di un'aggregazione eritrocitaria spontanea può essere dimostrata, osservando la mancanza di agglutinazione con siero anti-A e/o anti-B nella tipizzazione ABO.

Nella maggioranza dei casi, un controllo idoneo è costituito da una sospensione di emazie autologhe nel siero dello stesso paziente oppure in una soluzione al 6-8% di albumina bovina.



**Fig. 2-6 Anti-D and Rh control tubes.** The anti-D tube contains anti-D antibodies suspended in the high-protein diluent. The Rh control contains diluent and no anti-D antibodies.

Per alcuni campioni di globuli rossi D positivi, la dimostrazione della presenza del D richiede l'incubazione con il reattivo diagnostico, e l'aggiunta del siero antiglobuline umane (AHG), dopo incubazione con l'anti-D [test all'antiglobulina indiretto (TAI)].

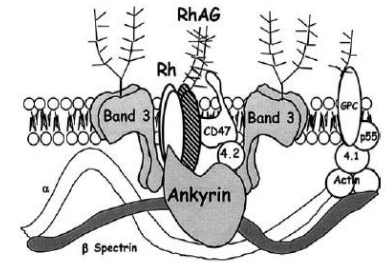
Queste emazie sono considerate D positive anche se si rende necessaria una fase addizionale dell'esame.

---

Attualmente sono disponibili tecniche molecolari che possono determinare direttamente il genotipo Rh.

La determinazione del genotipo con la metodologia della reazione della polimerasi a catena può essere eseguita utilizzando il DNA ottenuto dai leucociti o dagli amniociti oppure dal DNA fetale extracellulare presente nel plasma materno

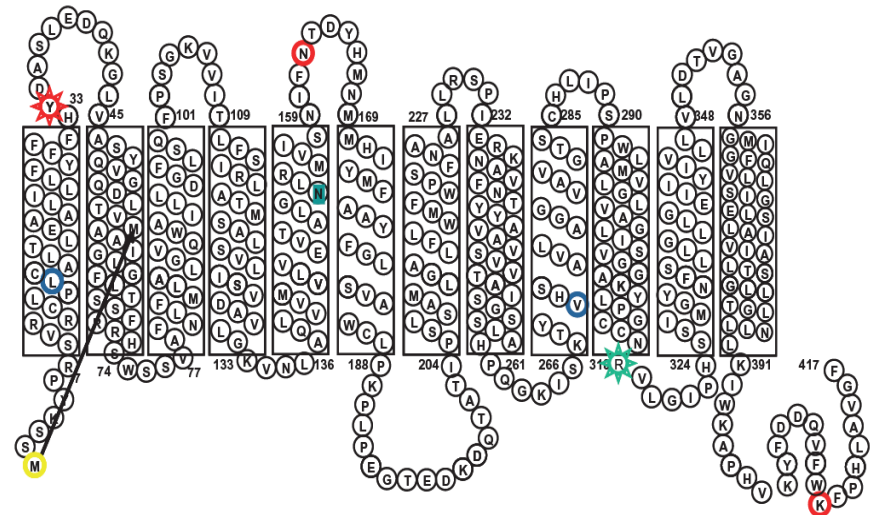
---



La trasfusione di sangue con un'espressione debole dell'antigene D in un ricevente D negativo non è raccomandata, perché alcune emazie di D debole o parziale possono evocare una risposta immune contro il D.

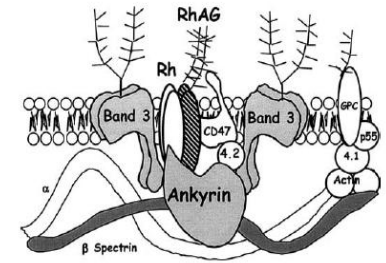
Le deboli espressioni del D, tuttavia, sembrano essere meno immunogene del sangue D positivo normale; la trasfusione di un totale di 68 unità di sangue con antigene D debole in 45 riceventi D negativi non ha stimolato in nessun caso la produzione di anti-D (*Chiu RW 2003*).

“To date **82 partial D** types and **77 weak D** types have been reported... and **17 DEL** types have also been described, with a very low expression of the D antigen



## Degli antigeni riconosciuti

---



20 hanno una frequenza tra l'1% e il 99% in almeno uno dei principali gruppi etnici

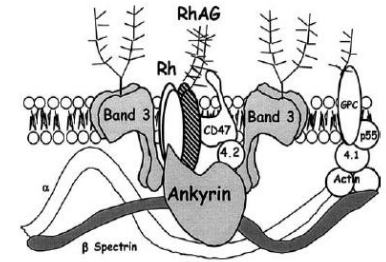
21 sono antigeni rari

8 sono antigeni ad alta frequenza

---



## Antigeni composti: ce, Ce, CE, cE



Alcuni anticorpi verso antigeni composti riconoscono gli eritrociti quando hanno specifici antigeni C/c e E/e codificati dallo stesso gene.

L'anti ce (anche conosciuto come anti-f) reagisce solo con cellule che hanno il complesso dce o Dce con c ed e in *cis*.

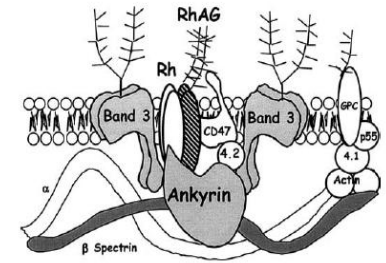
Perciò eritrociti D+C+c+E+e+ reagiranno con l'anti-ce se il genotipo è DCe/dce

con l'anti-Ce se il

genotipo è DCe/DcE

## Antigeni composti: G

---



L'anti-G reagisce con eritrociti che hanno D o C

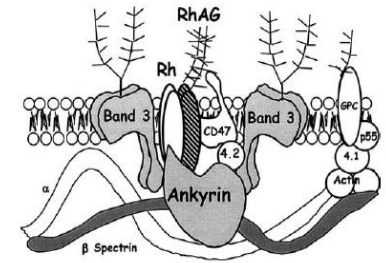
D+C+   D+C-   D-C+

Poiché sia D che C hanno una serina in posizione 103, questo anticorpo probabilmente riconosce la Ser103 se è inserita nel contesto della proteina D o CcEe

L'anti-C è invece probabilmente più dipendente dalla conformazione e riconosce la Ser103 solo nel contesto di una proteina CcEe.

---

## Antigeni composti: G

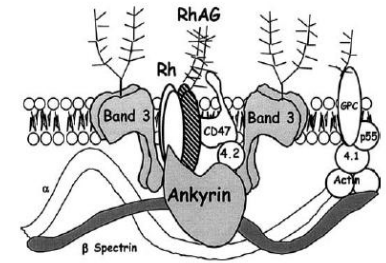


Gli anti-G appaiono inizialmente come una miscela di anti-D e anti-C, ma la loro reattività non può essere separata nelle componenti anti-C e anti-D.

Il fatto che il G appaia come un'entità unica comprendente le specificità C e D spiega perché persone D negative immunizzate con eritrociti C- D+ appaiono, qualche volta, aver prodotto anche un anti-C insieme con l'anti-D e perché le persone D negative, esposte a emazie C+ D-, producano anticorpi che sembrano contenere una componente anti-D.

## Altri antigeni

---



**C<sup>w</sup>** è un antigene a bassa frequenza in tutte le popolazioni (2,6% nella popolazione inglese).

**C<sup>x</sup>** è un antigene raro con un'incidenza tra lo 0,1% e lo 0,3% nei caucasici.

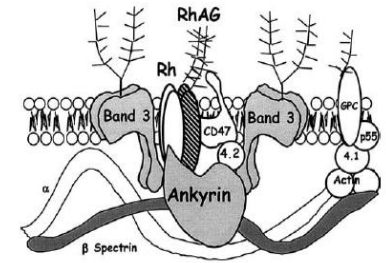
Sono determinati dalla sostituzione rispettivamente in Glu41Arg e Ala36Thr.

**MAR** è un antigene ad alta frequenza abolito dalla sostituzione di C<sup>w</sup> e C<sup>x</sup>, perciò probabilmente per la sua espressione sono necessarie Glu 14 e Ala37.

---

## Altri antigeni

---



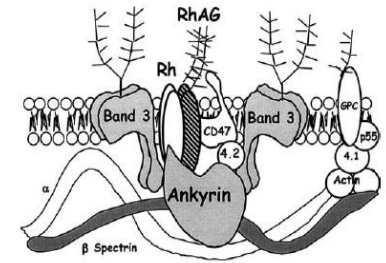
**VS** ha una frequenza del 30-40% nella popolazione nera Africana, mentre è raro negli altri gruppi etnici.

E' determinato da una sostituzione Leu245Val nella proteina CcEe ed è associato con un e debole.

Gli eritrociti VS<sup>+</sup> sono solitamente V<sup>+</sup> (Gly336Cys).

---

## Altri antigeni



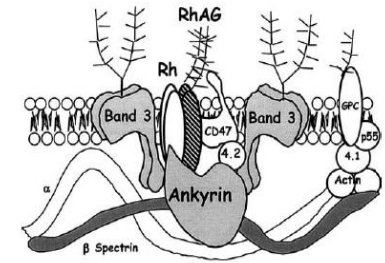
La letteratura riferisce almeno 43 persone in 14 famiglie i cui globuli rossi sembrano essere privi di tutti gli antigeni Rh.

Se immunizzati gli individui *Rhnull* possono produrre un anticorpo anti-Rh29, un anticorpo contro gli epitopi comuni ad entrambe le proteine Rh, che reagisce contro tutti gli eritrociti tranne gli *Rhnull*.

Gli eritrociti *Rhnull* sono morfologicamente e funzionalmente anomali.

## Altri antigeni

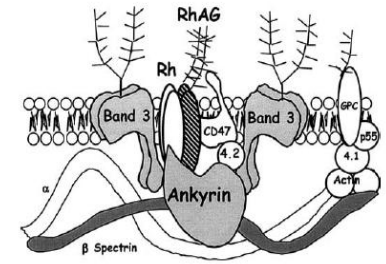
---



La severità dell'emolisi e la risultante anemia variano tra le persone che ne soffrono, ma la stomatocitosi, la ridotta sopravvivenza eritrocitaria, l'assenza degli antigeni LW e Fy5 e l'alterata e variabile espressione degli antigeni S, s ed U costituiscono una caratteristica costante.

---

## Altri antigeni



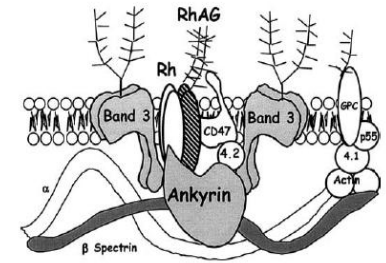
Il fenotipo Rhnull, viene prodotto da almeno due diversi meccanismi genetici.

Il più comune è l'Rhnull “regolatore” che origina da una mutazione nel gene *RHAG* che esita nella completa assenza del complesso Rh (polipeptidi Rh ed RhAG), necessario per l'espressione degli antigeni Rh.

Queste persone trasmettono i normali geni *RHD* ed *RHCE* ai loro discendenti.



## Altri antigeni



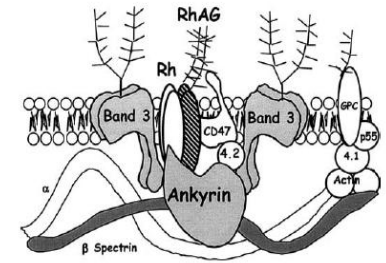
L'altra forma di Rhnul, il tipo “amorfo”, ha un gene *RHAG* normale ma presenta una mutazione in entrambi i geni *RHCE* associata alla delezione del gene *RHD* (come nei normali individui D negativi).

Il tipo amorfo di Rhnul è considerevolmente piu' raro del tipo regolatore.

I genitori ed i discendenti di questo tipo di Rhnul sono obbligatoriamente degli eterozigoti per il gene amorfo.

## Altri antigeni

---



Il fenotipo **Rhmod** rappresenta una soppressione meno completa dell'espressione antigenica Rh.

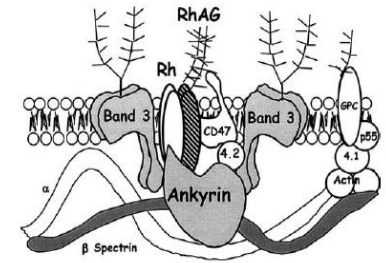
Diversamente dalle emazie Rhnull, quelle classificate come Rhmod non sono completamente prive degli antigeni Rh ed LW.

Come nei soggetti Rhnull anche negli Rhmod l'anemia emolitica è una caratteristica tipica.

Come nel fenotipo Rhnull di tipo regolatore, una mutazione presente nel gene *RHAG* si è dimostrata essere all'origine del fenotipo Rhmod.

---

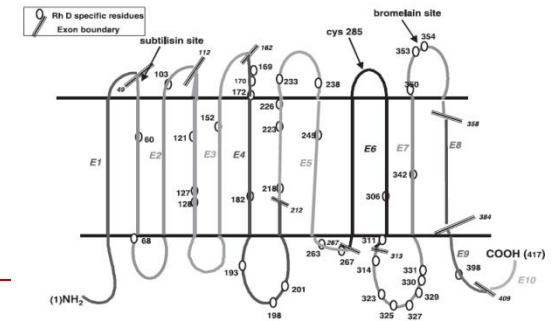
## Fenotipi deleti



Rari aplotipi RH codificano l'antigene D ma non codificano alcuni o tutti gli antigeni CE.

Si è dimostrato che questi rari fenotipi prendono origine dalla sostituzione di ampie porzioni del gene RHCE con parti del gene RHD.

Le emazie prive di C/c e/o di E/e possono presentare espressioni eccezionalmente forti del D: un'osservazione attraverso la quale, qualche volta, queste emazie sono state riconosciute durante la tipizzazione routinaria con l'anti-D.

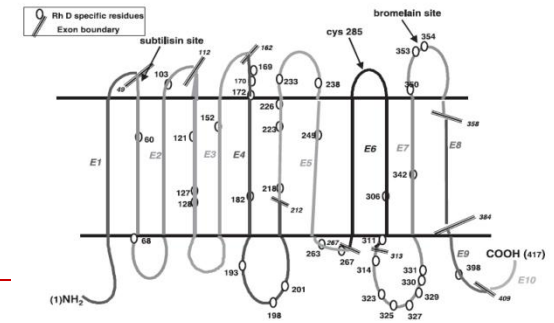


Questa dicotomia non è così netta.

Alcuni individui weak D (types 4.2 e 15) hanno prodotto l'anti-D.

Alcuni D parziali, come il DVI, presentano una espressione debole degli epitopi.

Un altro tipo di D variant è il DEL, in cui il D è espresso così debolmente da non poter essere identificato con le comuni metodiche sierologiche, e necessita di metodiche specialistiche quali adsorbimento ed eluizione.



Solo tre individui su mille tra Giapponesi e Cinesi sono apparentemente D-negativi.

Una parte sostanziale di questi presentano il fenotipo DEL.

Nonostante l'espressione molto molto bassa di D sugli eritrociti DEL, sono stati in grado di immunizzare riceventi D-negativi.

E' quindi ipotizzabile che tutti i D variant possano immunizzare riceventi D-negativi.

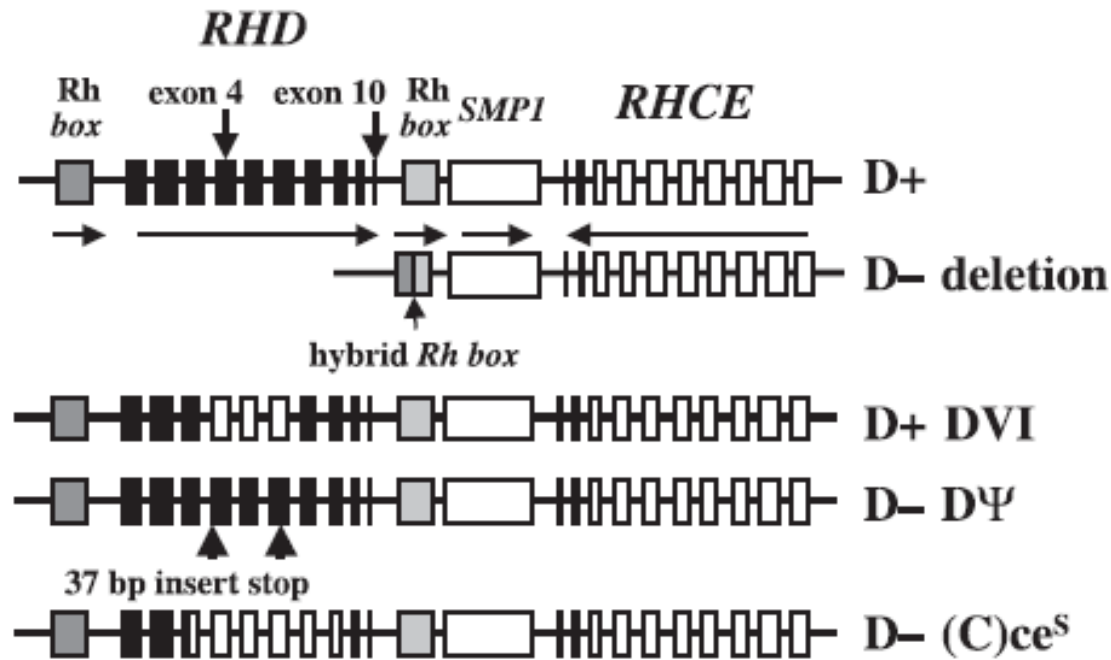
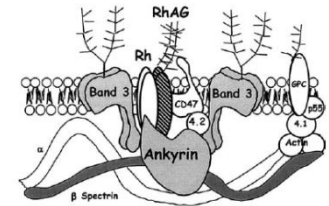


Fig. 2 Diagram of the Rh genes, the *Rh* boxes flanking *RHD*, and *SMP1* between *RHD* and *RHCE*, in five haplotypes, two producing D (D+) and three producing no D (D-).



## Tipizzazione sierologica dell'antigene RhD con 8 antisieri mono- e policlonali

---

**IgM (D175-2)+IgG (D415 1E4) *Dominion***

**IgM (D7B8)+ IgG (H1121G6, LORIFA) *Ortho***

**IgM (TH-28)+ IgG (MS-26) *Diamedix/Delta***

**IgM+IgG *Immucor***

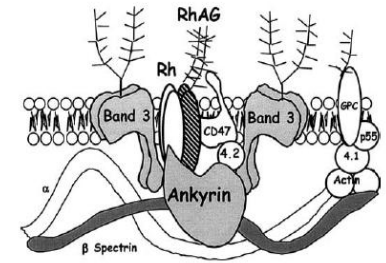
**IgM+IgG *Jacques Boy***

**IgM (MS-201) *Diamedix/Delta***

**IgG polyclonal *Ortho***

**Pools of human serum *Dominion***

---

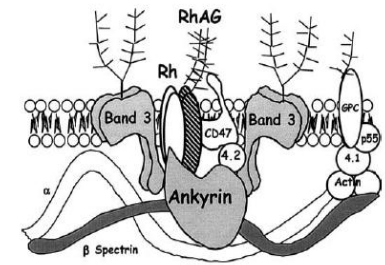


---

**Tipizzazione epitopi antigene D con metodica su  
colonna contenente un pannello di anticorpi  
monoclonali in una matrice di gel**

---





---

**Tipizzazione dei geni RHD e RHCE in biologia molecolare mediante reazione polimerasica a catena con l'uso di primer a sequenza allele specifica (PCR-SSP)**

---

## Tipizzazione di 20 pazienti con 3 metodiche

Pazienti	Tipizzazione sierologica	Metodica con Ab monoclonali	Metodica molecolare	Aplotipo
1	8/8	D	weak D type 1	CDe
2	8/8	D	weak D type1	CDe
3	8/8	weak D	weak D type2	cDE
4	8/8	weak D	weak D type2	cDE
5	8/8	weak D	weak D type1	CDe
6	8/8	D	weak D type1	CDe
7	8/8	weak D	DFR	CDe
8	8/8	weak D	weak D type1	CDe
9	8/8	weak D	weak D type1	CDe
10	7/8	weak D	weak D type1	CDe
11	8/8	DFR	DFR	CDe
12	8/8	weak D	weak D type2	cDE
13	5/8	DFR	weak D type5	cDE
14	2/8	D <sup>VI</sup>	D <sup>VI</sup> type II	CDe
15	4/4	weak D	weak D type1	CDe
16	4/4	weak D	weak D type1	CDe
17	3/8	D <sup>VI</sup>	D <sup>VI</sup> type II	CDe
18	7/7	DBT	DBT	CDe
19	8/8	weak D	weak D type2	cDE
20	7/8	weak D	weak D type2	cDE

## Hemagglutination

- Value
  - The “Gold Standard” method to detect the presence or absence of blood group antigens on RBCs that has served the transfusion community well
  - Simple and quick to perform, requires little in the way of equipment, and, when done correctly, has a specificity and sensitivity that is appropriate for the vast majority of transfusions
  - Detects mixed populations of RBCs
- Reagents
  - Specialized and obtained from immunized patients/donors (polyclonal and monoclonal antibodies) or from immunized mice (monoclonal antibodies)
  - Source material is a biohazard and is diminishing
  - Cost of FDA-approved, commercially licensed reagents is escalating
  - Many antibodies are not commercially available and are characterized (often only partially) by the user and some are limited in volume, weakly reactive, or not available
- Limitations
  - Is a subjective test
  - Requires use of reliable antisera
  - Labor-intensive testing so a relatively small number of donors can be typed for a relatively small number of antigens, which has limited the size of antigen-negative inventories
  - Indirect indication of a fetus at risk of hemolytic disease of the fetus/newborn
  - Difficult to phenotype a recently transfused patient
  - Difficult to phenotype RBCs coated with IgG
  - Can be difficult to distinguish an alloantibody from an autoantibody in antigen-positive people
  - Restricted ability to determine zygosity, especially RHD zygosity in D-positive individuals

## DNA testing, including DNA arrays

- Value
  - Can be automated
  - High throughput because multiple markers are tested simultaneously on one sample
  - Computerized interpretation and data entry into a patient/donor data base
  - Potential to precisely geno-match donor blood to the patient's type
- Reagents
  - Does not require special reagents, which can be readily purchased
- Limitations
  - Predict an antigen type; it is recommended that the prediction be confirmed by hemagglutination, particularly if negative for the antigen
  - Takes hours
  - DNA and hemagglutination test results may not agree
  - DNA results from somatic cells and from WBCs may not agree
  - More than one genotype can give rise to the same phenotype, especially with the null phenotypes
  - There is a high probability that not all alleles in all ethnic populations are known
  - For research use only; has not been approved by the FDA as the sole test on which to base decisions regarding patient care

## Table 2. Applications of PCR-based assays to predict a blood group antigen.

### Antigen Typing a Patient

- To identify a fetus at risk or not for hemolytic disease of the fetus and newborn (HDFN)
- When antibody is weak or not available (eg, anti-Do<sup>a</sup>, -Do<sup>b</sup>, -Js<sup>a</sup>, -V/Vs)
- Who has been recently transfused to aid in antibody identification and selection of RBCs for adsorption
- To distinguish an alloantibody from an autoantibody (eg, anti-e, anti-Kp<sup>b</sup>)
- To help identify alloantibody when a patient's RBCs type antigen-positive and a variant phenotype is suspected (eg, anti-D in a D-positive, anti-e in a e-positive)
- Whose RBCs are coated with immunoglobulin (+DAT)
- Who has received an allogeneic stem cell transplant
- To detect weakly expressed antigens where the patient is unlikely to make antibodies to transfused antigen-positive RBCs
- Identify molecular basis of unusual serological results, especially Rh variants
- To determine zygosity

### Antigen Typing for Donors

- Mass screening to increase antigen-negative inventory
- To find donors whose RBCs lack a high-prevalence antigen
- To resolve blood group A, B, D, C, and e discrepancies
- To detect genes that encode weak antigens
- To type donors for reagent RBCs for antibody screening cells and antibody identification panels

**Table 1**Representative molecular changes in *RHD* alleles expressing distinct phenotypes of the D antigen.

Classification of antigen variation	D antigen phenotype	Molecular basis		Representative example		Novel Rhesus antigen
		Protein variation	Mechanisms	<i>RHD</i> allele	Trivial name	
Partial D	Qualitative change	Amino acid substitution on the RBC surface	Missense mutation	<i>RHD</i> (G355S)	DNB	Unknown
		Protein segment exchange on the RBC surface	Gene conversion (hybrid protein)	<i>RHD</i> -CE(3-6)-D	DVI type 3	BARC
Weak D	Quantitative change	Amino acid substitution in the membrane or intracellularly	Missense mutation	<i>RHD</i> (V270G)	Weak D type 1	Unknown
DEL	Major quantitative change	Grossly reduced translation or protein expression	Missense mutation	<i>RHD</i> (M295I) in CDe	Not applicable	Unknown
			Mutation at splice site	<i>RHD</i> (K409K)	Not applicable	Unknown
D negative	D negative	Lack of protein expression	Gene deletion	<i>RHD</i> -Deletion	D negative	Unknown
			Nonsense mutation	<i>RHD</i> (Y330X)	Not applicable	Unknown
			Frame shift mutation	<i>RHD</i> (488del4)	Not applicable	Unknown
			Modifying gene	Defect of <i>RHAG</i> gene	Rh <sub>null</sub>	Unknown
Antithetical antigens of the RhCE protein	Expression of antigen E or antigen e	Protein segment exchange on the RBC surface	Gene conversion (hybrid protein)	<i>RHD</i> -CE(3-7)-D	Cde <sup>e</sup>	Unknown
		Amino acid substitution on the RBC surface	Missense mutation at amino acid position 226 in <i>RHCE</i>	<i>RHCE</i> allele:Ala226 coding antigen ePro226 coding antigen E	Not applicable	E versus e

(from Flegel *Transfusion and Apheresis Science* 2011)

Tuttavia questa dicotomia tra weak D e partial D appare oggi di valore limitato, poiché:

---

1. Alcuni D variant classificati come weak D (*weak D type 4.2, weak D type 15*) hanno prodotto anti-D;
2. Alcuni partial D hanno un'espressione fortemente indebolita degli epitopi che lo compongono.

## **DEL**

È un antigene D dall'espressione così debole da non poter essere identificato con le metodiche convenzionali sierologiche ma solo con tecniche speciali, quali assorbimento dell'anti-D e sua successiva eluizione dai globuli rossi.

Anche noto come "Asian type« DEL a causa della sua prevalenza negli asiatici D-negativi.

La sua importanza è legata soprattutto alla possibilità di determinare, nonostante la bassa espressione dell'antigene, un'alloimmunizzazione anti-D quando un donatore DEL-positivo è erroneamente etichettato come D-negativo.

Il sistema Rh è caratterizzato da una elevata immunogenicità e da una notevole complessità dal punto di vista genotipico.

Benché identificato più di 60 anni fa sono soprattutto gli studi dell'ultimo ventennio che hanno consentito di comprenderne i meccanismi molecolari.

---

Queste acquisizioni hanno ulteriormente sottolineato l'importanza di una corretta tipizzazione dell'antigene D per prevenire l'alloimmunizzazione nei soggetti trasfusi ed per una corretta gestione della incompatibilità materno-fetale.

La biologia molecolare rappresenta un importante strumento diagnostico per la caratterizzazione delle varianti dell'antigene D, anche se non sempre attuabile in routine.

---

Fino a poco tempo fa, nella maggioranza degli esami si utilizzavano reagenti anti-D policlonali di origine umana.

In tempi più recenti, sono diventati ampiamente disponibili reattivi monoclonali anti-D.



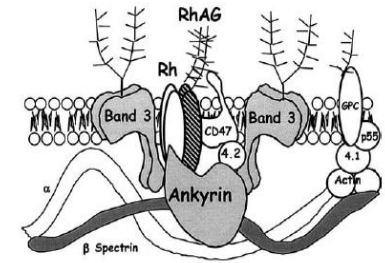
---

I reattivi monoclonali anti-D sono prevalentemente costituiti da anticorpi umani di classe IgM che agglutinano efficacemente la maggior parte delle emazie D-positive.

I reattivi monoclonali solitamente producono reazioni più forti di quelle ottenute con i reattivi policlonali di classe IgG, ma possono occasionalmente fallire l'agglutinazione delle emazie dei soggetti appartenenti ad alcune categorie di D parziali.

---

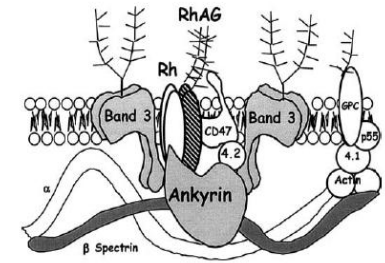
Aggiungendo delle piccole aliquote di anticorpi IgG ai monoclonali di classe IgM si produce una miscela di anticorpi che reagiranno con gli antigeni D deboli o con D parziali nel test all'antiglobulina.



L'origine etnica influenza le deduzioni relative al genotipo, perché la frequenza dei geni Rh si diversifica da un gruppo geografico all'altro.

In un bianco con fenotipo Dce, il genotipo sarà probabilmente *Dce/ce*

In una persona di origine africana esso può essere, con la stessa probabilità, sia *Dce/Dce* che *Dce/ce*.



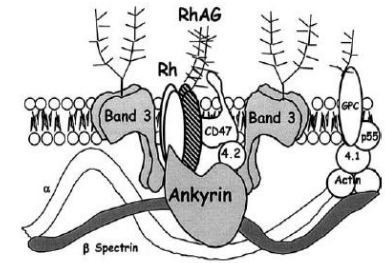
---

L'interazione tra i geni esita nel cosiddetto “effetto posizione”.

Se l'interazione avviene tra geni o fra il prodotto di geni posti sullo stesso cromosoma viene indicata come effetto *cis*.

Se un gene, o il suo prodotto, interagisce con quello di un altro gene posizionato sul cromosoma omologo l'interazione viene indicata come effetto *trans*.

---



---

**Effetto *cis*:** l'antigene E prodotto da *DcE* è quantitativamente meno espresso dell'E prodotto da *cE*.

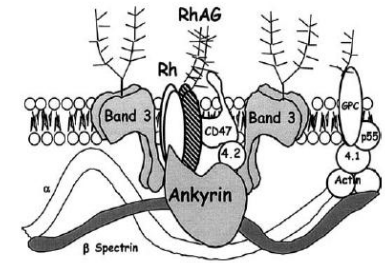
**Effetto *trans*:** sia il C che E sono meno espressi quando sono codificati dal genotipo *DCe/DcE* rispetto agli antigeni codificati, rispettivamente, da *DCe/ce* o *DcE/ce*.

---

**Tabella 14.1** - Gli antigeni del sistema gruppale Rh e la loro frequenza

Designazione numerica	Nome dell'antigene	Incidenza (%)*			Designazione numerica	Nome dell'antigene	Incidenza (%)*		
		Bianchi	Neri	Totale			Bianchi	Neri	Totale
Rh1	D	85	92		Rh32	Rh32	<0,01	1	
Rh2	C	68	27		Rh33	Har			<0,01
Rh3	E	29	22		Rh34	Bastiaan			>99,9
Rh4	c	80	96		Rh35	Rh35			<0,01
Rh5	e			98	Rh36	Be <sup>a</sup>			<0,1
Rh6	f	65	92		Rh37	Evans			<0,01
Rh7	Ce	68	27		Rh39	C-like			>99,9
Rh8	C <sup>w</sup>	2	1		Rh40	Tar			<0,01
Rh9	C <sup>x</sup>			<0,01	Rh41	Ce-like	70		
Rh10	V	1	30		Rh42	Ce <sup>s</sup>	<0,1	2	
Rh11	E <sup>w</sup>			<0,01	Rh43	Crawford			<0,01
Rh12	G	84	92		Rh44	Nou			>99,9
Rh17	Hr <sub>0</sub>			>99,9	Rh45	Riv			<0,01
Rh18	Hr			>99,9	Rh46	Rh46			>99,9
Rh19	hr <sup>s</sup>			98	Rh47	Dav			>99,9
Rh20	VS	<0,01	32		Rh48	JAL			<0,01
Rh21	C <sup>G</sup>			68	Rh49	STEM	<0,01	6	
Rh22	CE			<1	Rh50	FPTT			<0,01
Rh23	D <sup>w</sup>			<0,01	Rh51	MAR			>99,9
Rh26		80	96		Rh52	BARC			<0,01
Rh27	cE	28	22		Rh53	JAHK			<0,01
Rh28				<0,01	Rh54	DAK			<0,01
Rh29	total Rh			>99,9	Rh55	LOCR			<0,01
RH30	Go <sup>a</sup>	0	<0,01		Rh56	CENR			<0,01
Rh31	hr <sup>B</sup>			98					

(\*) Incidenza percentuale in bianchi e neri dove appropriata<sup>8,9</sup>.



**Table 4.2** Estimated numbers of antigen sites per red cell (in thousands).

Phenotype	Antigens			
	D	C	c	e
D <sub>Ce</sub> /d <sub>ce</sub>	10–15	22–40	37–53	18–25
D <sub>Ce</sub> /D <sub>Ce</sub>	15–23	46–57	0	18–25
D <sub>cE</sub> /D <sub>cE</sub>	16–33	0	70–85	0
D <sub>Ce</sub> /D <sub>cE</sub>	23–31	26–40	37–53	14–15
d <sub>ce</sub> /d <sub>ce</sub>	0	0	70–85	18–25