



## TESIS DOCTORAL

# Diseño, desarrollo y validación del test de genotipado sanguíneo ID RHD XT.

Determinación de las variantes genéticas más frecuentes que codifican la expresión nula o débil del antígeno eritrocitario RhD.

**Autora: Izaskun Apraiz Sahagún**

**Directores: Santos Alonso Alegre / Mónica López Martínez**

**Departamento: Genética, Antropología Física y Fisiología Animal**

**Centro: Facultad de Ciencia y Tecnología**

**2019**

eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

# TESIS DOCTORAL

## **Diseño, desarrollo y validación del test de genotipado sanguíneo ID RHD XT.**

Determinación de las variantes genéticas más frecuentes que codifican la expresión nula o débil del antígeno eritrocitario RhD.

**Autora: Izaskun Apraiz Sahagún**

**Directores: Santos Alonso Alegre / Mónica López Martínez**

Departamento: Genética, Antropología Física y Fisiología Animal

Centro: Facultad de Ciencia y Tecnología

**2019**

## Agradecimientos

No puedo presentar esta tesis doctoral sin agradecer a la empresa Progenika Biopharma, a Grifols Company, la oportunidad que me ha brindado para participar en este proyecto y seguir formandome profesionalmente. Quisiera realizar un especial agradecimiento a los múltiples centros colaboradores que han ido recopilando las muestras clínicas lo que ha permitido realizar una evaluación del test muy exhaustiva.



Quiero continuar dando las gracias a todo el equipo del laboratorio de Grifols en San Marcos, Texas (EE.UU) quienes me trataron como a una más e incorporaron mi aprendizaje en sus muchas tareas del día a día y siempre estuvieron dispuestos para formarme.

Llega el momento de ponerse un poco más sentimental y echar la vista atrás a todos estos años en Progenika, recordando mis primeras prácticas en el Departamento de servicios. Allí recibí mis primeras enseñanzas, allí di mis primeros pasos en investigación. Quién iba a pensar entonces que aquello era el inicio de este desafío. Aún recuerdo mi primer día cuando aprendí el significado de la palabra «poyata».

Después continué por el departamento de I+D genómica donde me he iniciado en el mundo del genotipado sanguíneo gracias a la formación que me han ido dando mis compañeras y compañeros; algunos de ellos están hoy involucrados en otros proyectos, pero siempre me han tendido la mano y han estado disponibles para ayudarme en esta etapa.

También quiero mencionar a mi actual grupo de trabajo bautizado como “Sois unas cracks, y lo sabemos” donde nos enfrentamos día a día a nuevos objetivos. Ya se que los *deadlines* nos aprietan, pero ... ¡nosotras podemos!

No me puedo olvidar de los departamentos sin los que este proyecto no se hubiera podido desarrollar: Departamento de producción, Departamento de IT, y Control de Calidad. El agradecimiento no es sólo por todo el trabajo realizado, sino también más personal porque me habéis ayudado tanto con las dudas que me han ido surgiendo, como en darme el apoyo que he necesitado en distintos momentos en los que veáis que podía caerme. Incluyo aquí a todas aquellas personas que me habéis aguantado mi frase monotema: “No tengo vida, sólo curro y hago tesis”.

He reservado para el final mi más especial agradecimiento a mis directores de tesis, el Doctor Santos Alonso Alegre y la Doctora Mónica López Martínez quienes me dieron la oportunidad y me han apoyado durante todo este largo y tedioso camino. Mónica, tú has sido la artífice de esta idea y has apostado por mi, pensando en mi evolución profesional a lo largo de estos años en Progenika y ofreciéndome este gran reto cuya meta, espero alcanzar cumpliendo las expectativas que depositaste en mi. Santos, tú has sido otro gran pilar en este proyecto ya que no sólo me ha hecho reflexionar sobre cada línea que ha quedado escrita en esta tesis, sino que me has enseñado a ser metódica, a que me cuestione todo y no de nada por sentado y, sobre todo, la disciplina para escribir. De ti he aprendido que tan importante es hacer miles de experimentos durante la investigación como transmitir con las palabras los resultados de forma homogénea, siendo clara y concisa. Esta claro, que aun tengo mucho que aprender, Santos, y seguro que por estas líneas queda algo sin estar homogéneo del todo.

**Eskerrik asko!!**

Izaskun Apraiz Sahagún

En Bilbao, 28 octubre 2019

<b>Agradecimientos .....</b>	<b>2</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>7</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>8</b>
1. <i>Sistema Rh.....</i>	8
1.1 Descripción .....	8
1.2 Descubrimiento e historia del sistema Rh .....	8
1.3 Nomenclatura del sistema Rh .....	10
1.4 Estructura molecular del locus Rh .....	12
1.5 Antígenos del sistema Rh: Antígeno D.....	14
2. <i>Sistema plaquetario humano (Human Platelet Antigens (HPA)).....</i>	23
2.1 Nomenclatura de los HPAs.....	23
2.2 Bases moleculares de HPA.....	23
3. <i>Importancia clínica de los sistemas sanguíneos Rh y HPA.....</i>	25
3.1 Aloinmunización .....	25
3.2 Sistema Rh: Enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN) o eritroblastosis.....	26
3.3 Sistema HPA: Trombocitopenia fetal o neonatal aloinmune (TFNA) .....	28
4. <i>Métodos de identificación del fenotipo sanguíneo: inmunohematología .....</i>	29
4.1 Métodos serológicos .....	29
4.2 Métodos moleculares.....	38
4.3 Aplicaciones de los métodos moleculares en medicina transfusional.....	47
<b>Objetivos.....</b>	<b>49</b>
<b>Material y Métodos.....</b>	<b>50</b>
<i>Fase 1: Diseño y optimización del test de genotipado sanguíneo (ID RHD XT).....</i>	50
1.1 Descripción del test genético: variantes seleccionadas .....	50
1.2 Muestras biológicas para la construcción de la genoteca con las variantes alélicas de interés .....	51
1.3 Test de genotipado ID RHD XT.....	56
<i>Fase 2: Desarrollo del prototipo .....</i>	79
2.1 Optimización de las condiciones de fabricación .....	80
2.2 Determinación de controles de calidad a incluir con cada kit comercializado .....	81
<i>Fase 3: Validación del test.....</i>	91
3.1 Estudio estabilidad real.....	94
3.2 Estudio del vial abierto ( <i>Open Vial</i> ).....	94
3.3 Estudio de detección del límite inferior.....	98
3.4 Estudio de detección del límite superior.....	99
3.5 Estudio de verificación de termocicladores .....	100
3.6 Sustancias interferentes .....	100
3.7 Estudio de precisión intermedia .....	102
3.8 Estudio de tolerancia a la variabilidad en el protocolo ( <i>Guard banding</i> ).....	105
3.9 Estudio de estabilidad a temperatura extrema (estabilidad al “estrés”).....	112

3.10 Estudio de reproducibilidad .....	113
3.11 Evaluación del rendimiento del test a partir de muestras individuales ( <i>Performance evaluation of individual samples</i> ).....	114
3.12 Evaluación del rendimiento del test a partir de mezclas de muestras de sangre y de ADN ( <i>Performance evaluation of pooled donor samples</i> ).....	116
<b>Resultados .....</b>	<b>127</b>
<i>Fase 1: Diseño y optimización del test de genotipado sanguíneo (ID RHD XT) .....</i>	<i>127</i>
1. Test de genotipado ID RHD XT .....	127
<i>FASE 2: Desarrollo del prototipo .....</i>	<i>170</i>
2. Determinación de controles de calidad .....	170
2.1. Control de calidad determinados para la PCR Master Mix (PMM) y sus materias intermedias.....	170
2.2. Control de calidad determinados para la Bead Master Mix (BMM) y sus reactivos intermedios .....	176
2.3. Control de calidad determinado para el SAPE .....	190
2.4. Control de calidad determinado para el SAPE DILUTION BUFFER .....	191
<i>FASE 3. Validación del test.....</i>	<i>193</i>
3.1 Estudio de estabilidad real .....	194
3.2 Estudio del vial abierto ( <i>Open Vial</i> ).....	196
3.3 Estudio de detección del límite inferior .....	198
3.4 Estudio del límite superior de detección.....	200
3.5 Estudio de verificación de los termocicladores .....	202
3.6 Sustancias interferentes.....	203
3.7 Estudio de precisión intermedia.....	205
3.8 Estudio de tolerancia a la variabilidad en el protocolo (Guard Banding) .....	207
3.9 Estudio de estabilidad a temperaturas extremas (Estabilidad al “estrés”) .....	208
3.10 Estudio de reproducibilidad .....	209
3.11 Evaluación del rendimiento del test a partir de muestras individuales ( <i>Performance Evaluation of individual samples</i> ).....	210
3.12 Evaluación del rendimiento del test a partir de mezclas de muestras de sangre y de adn ( <i>Performance Evaluation of pooled donor samples</i> ).....	225
<b>Discusión.....</b>	<b>230</b>
<i>FASE 1. Diseño y optimización del test de genotipado sanguíneo (ID RHD XT).....</i>	<i>231</i>
<i>FASE 2. Desarrollo del prototipo .....</i>	<i>239</i>
<i>FASE 3. Validación del test.....</i>	<i>241</i>
Resumen de los estudios analizados .....	242
<b>Conclusiones .....</b>	<b>253</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>254</b>
<b>Apéndices.....</b>	<b>265</b>
<i>Apéndice 1. Resumen del número total de observaciones para cada fenotipo predicho en todas las muestras y réplicas del estudio de estabilidad real. ....</i>	<i>265</i>

<i>Apéndice 3. Resumen de los resultados para cada fenotipo predicho en todas las muestras y réplicas por nivel de concentración de ADN y por lote de reactivo correspondiente al estudio de límite de detección inferior</i> .....	287
<i>Apéndice 4. Análisi Probit de los "call rate"</i> .....	289
<i>Apéndice 5. Resumen de los resultados para cada fenotipo predicho en todas las muestras y réplicas por nivel de concentración de ADN y por lote de reactivo correspondiente al estudio de límite de detección superior</i> .....	295
<i>Apéndice 6. Resumen de los resultados para cada fenotipo predicho en todas las muestras y réplicas analizadas en el estudio de verificación de termocicladores</i> .....	297
<i>Apéndice 7. Resumen de los resultados para cada fenotipo predicho en todas las muestras, condiciones (con y sin interferentes) y réplicas analizadas en el estudio de sustancias interferentes.</i>	300
<i>Apéndice 8. Resumen de los resultados para cada fenotipo predicho en todas las muestras analizadas en el estudio de precisión intermedia</i> .....	308
<i>Apéndice 9. Análisis de resultados de componentes de varianza correspondientes al estudio precisión intermedia</i> .....	309
<i>Apéndice 10. Resumen de los resultados para cada fenotipo predicho en todas las muestras analizadas en el estudio de tolerancia a la variabilidad en el protocolo ("Guard banding").</i> .....	320
<i>Apéndice 11. Condiciones testadas en el paso de amplificación del ADN (Estudio de tolerancia a la variabilidad en el protocolo (Guard banding))</i> .....	322
<i>Apéndice 12. Condiciones testadas en el paso de hibridación del producto amplificado (Estudio de tolerancia a la variabilidad en el protocolo (Guard banding))</i> .....	324
<i>Apéndice 13. Condiciones testadas en el paso de marcaje (Estudio de tolerancia a la variabilidad en el protocolo (Guard banding))</i> .....	325
<i>Apéndice 14. Condiciones testadas en el paso de adquisición de datos con Luminex (Estudio de tolerancia a la variabilidad en el protocolo (Guard banding))</i> .....	326
<i>Apéndice 15. Resumen de los resultados para cada fenotipo predicho en todas las muestras analizadas en el estudio de estabilidad a temperaturas extremas "estrés"</i> .....	327
<i>Apéndice 16. Resumen de los resultados para cada fenotipo predicho en todas las muestras analizadas en el estudio de reproducibilidad</i> .....	333
<i>Apéndice 17. Resumen de resultados obtenidos con el test ID RHD XT versus los resultados de serología en el estudio evaluación del test a partir de muestras individuales.</i> .....	338
<i>Apéndice 18. Resumen de resultados obtenidos con el test ID RHD XT versus los resultados de secuenciación bidireccional en el estudio evaluación del test a partir de muestras individuales.</i> .....	435

## Resumen

Los antígenos del sistema Rh son los responsables de las reacciones hemolíticas asociadas a la incompatibilidad sanguínea donante – receptor, de la inmunización en los pacientes politransfundidos, de la enfermedad del feto y del recién nacido (EHRN) como consecuencia de la incompatibilidad sanguínea materno-fetal (Connie 2010; Keramati *et al*; 2011) y de algunas anemias hemolíticas autoinmunes (Flegel, 2011).

Debido a que algunas variantes del gen *RHD* son difíciles de detectar serológicamente y podrían ser mal descritas como Rh D negativo (D-), es necesario realizar un estudio exhaustivo de los donantes D- para identificar las unidades de hematíes que potencialmente pueden causar aloinmunización. Algunas de estas variantes D del sistema Rh potencialmente inmunogénicas, como DEL, D parcial, y algunos tipos weak D, con frecuencia no son detectados por pruebas serológicas de rutina (Daniels, 2013a). Como consecuencia, individuos D- transfundidos con sangre de donantes negativos mal clasificados (en realidad son D+ de difícil detección) pueden sufrir riesgo de aloinmunización anti-D.

Para superar esta limitación serológica, el objetivo de este proyecto ha sido el desarrollo de una herramienta de detección molecular denominada ID RHD XT, basada en PCR multiplex y detección por tecnología X-MAP de Luminex®, aplicable tanto en pacientes como en donantes, que nos permita detectar ciertas variantes del gen *RHD*, así como los antígenos plaquetarios HPA-1a y HPA-1b (los cuales desempeñan un papel crucial por ser causantes de la trombocitopenia fetal/neonatal aloinmune o TFNA).

Durante las fases de diseño, desarrollo de este test de genotipado en el que además se han cumplido los criterios preestablecidos de calidad y en el los resultados en los estudios de verificación realizados son positivos se puede afirmar que el ensayo es preciso y fiable.

El desarrollo de este ensayo constituye una herramienta aplicable en la rutina de los bancos de sangre como apoyo a la serología, lo que conduce a una mejora de la calidad de la asistencia sanitaria en la población reduciendo los problemas inmunológicos asociados a la terapia transfusional.

# Introducción

## 1. Sistema Rh

### 1.1 Descripción

El complejo y muy polimórfico grupo sanguíneo Rh (ISBT- 004 – RH) es uno de los 36 sistemas de grupos sanguíneos humanos conocidos (ISBT, 2019a) (Avent, 2000). Su interés clínico en la rutina transfusional, la obstetricia y la hematología se debe a la implicación de sus anticuerpos en los procesos inmunes de hemólisis.

Los antígenos del sistema Rh sólo se encuentran en humanos y algunos primates no humanos, como, por ejemplo, los chimpancés y gorilas, y se expresan únicamente en la membrana de los hematíes y en las células precursoras de linaje eritrocitario (Schenkel-Brunner, 2000). Son los responsables de las reacciones hemolíticas asociadas a la incompatibilidad sanguínea donante – receptor, de la inmunización en los pacientes politransfundidos, de la enfermedad del feto y del recién nacido (EHRN) como consecuencia de la incompatibilidad sanguínea materno-fetal (Connie 2010; Keramati *et al*; 2011), así como de algunas anemias hemolíticas autoinmunes (Flegel, 2011). Asimismo, en Antropología, estos marcadores sanguíneos se han utilizado para estudiar las relaciones evolutivas entre diversos grupos poblacionales (Cavalli-Sforza *et al.*, 1994). La complejidad del sistema está en que, hasta el momento, se han definido 60 antígenos (ISBT, 2019b) de los cuales cinco (D, C, c, E y e) son clínicamente relevantes por su alta inmunogenicidad (Baptista-Gonzalez, 2005; Denomme, 2011) y su capacidad de inducir la producción de aloanticuerpos cuando no se respeta la compatibilidad donante-receptor para cada uno de ellos (Muñiz *et al.*, 2012a). A nivel molecular en el sistema se han definido más de 250 alelos, de manera que su estructura genómica es muy polimórfica (ISBT, en el 2010 se estimó que, a nivel mundial, 373.300 neonatos se vieron afectados con la enfermedad hemolítica Rh, con una prevalencia estimada de 276 por 100.000 nacidos vivos. Y para regiones específicas como el sureste asiático / países del Pacífico, Latinoamérica, Norte de África/Medio Oriente, Sur de Asia, África sub-sahariana y Europa Oriental/Asia central, su prevalencia ha sido estimada en 57, 252, 278, 385, 386 y 529 por cada 100.000 nacidos vivos, respectivamente. Estas cifras contrastan con la prevalencia de enfermedad Rh de 2,5 por 100.000 nacidos vivos observada en países que tienen una buena infraestructura de salud, que incluyen el cuidado perinatal y neonatal coordinado para todos los embarazos (Urdaneta *et al.*, 2018).

### 1.2 Descubrimiento e historia del sistema Rh

Existe cierta controversia sobre a quién atribuir el descubrimiento del sistema Rh. El primer tipo de sangre rhesus fue descubierto en 1937 por Landsteiner y Wiener, quienes lo nombraron después de un factor similar encontrado en la sangre de mono *Macacus Rhesus*. La importancia

## Introducción

de semejante hallazgo no fue evidente hasta que, en 1939, Levine y Stetson publicaron en un primer informe sobre las consecuencias clínicas del factor Rh no reconocido. Describieron sus consecuencias clínicas en el contexto de un caso de reacción hemolítica sufrida por una mujer que había sido transfundida con sangre ABO compatible de su esposo y que previamente había dado a luz a un feto muerto (Trucco Boggione, 2016). Los anticuerpos observados por Levine, hallados en el suero materno, aglutinaban los glóbulos rojos, incluidos los del esposo, del 80% de la población ABO de individuos de origen europeo. A la vista de este hallazgo, Levine y Stetson atribuyeron la incompatibilidad transfusional a la presencia, en la madre, de un anticuerpo formado por inmunización a un antígeno fetal, heredado del padre. Este anticuerpo sería el responsable de la reacción frente a los glóbulos rojos del esposo, así como del cuadro clínico desarrollado por el hijo (Trucco Boggione, 2016), hoy llamado enfermedad hemolítica fetoneonatal (EHRN) o eritroblastosis (Levine, *et al.*, 1939).

En 1940, Karl Landsteiner y Alexander S. Wiener hicieron la conexión con su descubrimiento anterior, y aislaron anticuerpos generados por conejos y cobayas inmunizados con sangre de mono *Macacus rhesus* (suero anti-rhesus) (Trucco Boggione, 2016). Éstos originaban un hetero-anticuerpo que aglutinaba no sólo los hematíes de macaco, sino también los hematíes del 85% de individuos de origen europeo, al igual que ocurría con el suero de la gestante descrita por Levine. Se estableció una identidad genética entre ambos antígenos y así subsecuentemente pasó a denominarse antígeno Rh. Los individuos cuyos eritrocitos eran aglutinados por el suero anti-rhesus fueron clasificados como Rh positivos, mientras que el 15% restante se denominaron Rh negativos (Trucco Boggione, 2016).

En ese momento, los investigadores creyeron que éste era el mismo anticuerpo descrito en el caso de Levine un año antes, y consideraron que los anticuerpos de origen animal y humano identificaban un mismo factor presente en los eritrocitos humanos y de monos (Trucco Boggione, 2016).

El motivo de la confusión fue que el anticuerpo hallado por Landsteiner y Wiener reacciona con los hematíes que en la actualidad son clasificados como D positivo, pero también con los D negativo, aunque preferentemente con los primeros. Al diluir el suero para eliminar la reactividad anti-especie, la única reacción que persistía era con los eritrocitos D positivo creando la falsa impresión de que ésta era la especificidad del anticuerpo (Landsteiner *et al.*, 1941, Trucco Boggione, 2016). Hasta 1961 no quedó completamente aclarada dicha confusión, cuando Levine y col. demostraron que el anticuerpo de origen humano y el anticuerpo anti-rhesus de origen animal no reaccionaban con un único antígeno (Trucco Boggione, 2016), sino con dos, el antígeno Rh, definido por los alo-anticuerpos que estaban presentes en el caso descrito por Levine, y el antígeno LW (Landsteiner–Wiener), definido por los hetero-anticuerpos producidos con los hematíes de *Macacus rhesus* (Levine, *et al.*, 1963). Este segundo antígeno es más

abundante en los hematíes Rh positivo, lo que explica la confusión inicial. (Avent, 2000; Scott, 2004).

A pesar de ello, se había extendido tanto el término Rh en la práctica transfusional que se mantuvo el nombre, si bien el anticuerpo humano descubierto por Levine y Stetson está dirigido contra el antígeno "D" del sistema Rh. En la práctica médica, el término "Rh positivo" y "Rh negativo" sigue definiendo la presencia o ausencia del antígeno D en un individuo (Trucco Boggione, 2016).

A mediados de los años cuarenta, se identificaron cuatro antígenos más. Estos antígenos eran dos pares de antígenos antitéticos, es decir, antígenos producidos por diferentes alelos de un determinado locus, denominados C/c y E/e relacionados estrechamente entre sí y a su vez con el antígeno D.

Durante los últimos 20 años se ha ido ampliando el conocimiento sobre la variabilidad genética del locus *RH*, los cuales han contribuido a la descripción de numerosos alelos. Los estudios en diferentes poblaciones han puesto de manifiesto las distintas prevalencias de estos alelos con las consiguientes implicancias clínicas, tanto en la práctica transfusional como en el control inmunohematológico de las embarazadas (Trucco Boggione, 2016).

---

### 1.3 Nomenclatura del sistema Rh

En 1943, Fisher y Race, asumieron que las tres series de los antígenos (D, C y E) estaban codificados por 3 genes separados, cada uno con dos alelos, siendo sus antígenos D/d, C/c y E/e respectivamente (Fisher y Race, 1946; Trucco Boggione, 2016). Estos 3 *loci* estarían estrechamente ligados formando los haplotipos Dce, DCE, DCe, DcE, dce, dCe, dcE y dCE, haplotipos que se transmiten de una generación a otra como una unidad o complejo génico. Cada gen controlaría la presencia del antígeno correspondiente en los eritrocitos (Fisher y Race, 1946; Trucco Boggione, 2016). El sistema o nomenclatura Fisher-Race es el que se usa más comúnmente en la actualidad.

La otra teoría sobre la herencia del sistema Rh fue propuesta en 1951 (Wiener, 1951) y se basaba en la asunción de un solo gen con múltiples alelos. Cada gen produciría un antígeno sobre el cual podrían identificarse varios factores, capaces de reaccionar con los anticuerpos específicos (Trucco Boggione, 2016). El sistema Wiener utilizó la nomenclatura Rh – Hr. En esta teoría un alelo R<sub>1</sub> da lugar a los "factores sanguíneos" Rh<sub>0</sub>, rh' y rh" (correspondientes a la nomenclatura moderna de los antígenos D, C y E) y el alelo r para producir hr' y hr" (correspondiente a la nomenclatura moderna de los antígenos c y e) (Wiener, 1951).

## Introducción

En 1962, se propuso una nomenclatura de tipo numérico independiente de la genética del sistema Rh (Rosenfield, 1962). Cada antígeno es identificado con un número asignado previamente al antisuero con el cual reacciona. De tal manera, para expresar un determinado fenotipo, el símbolo Rh es seguido por el número del antisuero utilizado, demostrando así la reacción positiva y la presencia del antígeno. En el caso de una reacción negativa, se anota el número del antisuero precedido de un signo menos (Rosenfield *et al.*, 1962; Trucco Boggione, 2016).

Posteriormente, en 1986 se hipotetizó la existencia de dos loci estrechamente relacionados entre sí, el primer locus era D con dos alelos, "D" y "no D", y el segundo era CcEe, con 4 alelos: "ce", "Ce", "cE" y "CE" (Tippet, 1986). Esta teoría coincide, a excepción de la existencia de un antígeno "no D", con el modelo propuesto por Colin y *et al.* (1990).

El modelo de Colin y cols. plantea la presencia de dos genes altamente homólogos con similar organización molecular en el genoma de individuos D positivo que denominaron RHD y RHCE, mientras que en el locus *RH* de individuos D negativo sólo se encontraría el gen *RHCE* (Colin *et al.*, 1991; Trucco Boggione, 2016).

Por último, la International Society of Blood Transfusion (ISBT) propuso una nomenclatura para el sistema Rh el cual tiene asignado el número 004 y cada antígeno tres dígitos más. Así, al antígeno D le corresponde 001, al C 002, al E 003, al c 004, al e 005 (Trucco Boggione, 2016), y así sucesivamente (<https://www.isbtweb.org>).

En la actualidad, la terminología empleada para referirse por escrito a los antígenos, genes y proteínas Rh está sujeta a las siguientes reglas: los antígenos se expresan empleando sus correspondientes letras (D, C, c, E, e), los genes *RH* se expresan empleando mayúsculas y, generalmente, en cursiva (*RHD* y *RHCE*) y, finalmente, las proteínas se expresan como RhD, o Rhce, RhCe, RhcE y RhCE, según los antígenos presentes en ellas (Daniels, *et al.*, 1995; Trucco Boggione, 2016).

En la **Tabla 1** se muestran las nomenclaturas propuestas por Fisher- Race, Wiener, Rosenfield y de la ISBT para los principales antígenos del sistema Rh y la equivalencia entre ellas (Trucco Boggione, 2016).

Tabla 1. Nomenclatura para los 5 antígenos principales del sistema Rh.

Nomenclaturas			
Fisher-Rice	Wiener	Rosenfield	ISBT
D	Rh <sub>0</sub>	Rh1	004001
C	rh'	Rh2	004002
E	rh''	Rh3	004003
c	hr'	Rh4	004004
e	hr''	Rh5	004005

## 1.4 Estructura molecular del locus Rh

El cluster Rh está constituido por dos genes homólogos, *RHD* y *RHCE*, en el brazo corto del cromosoma 1 en la posición p34.3-36.13 y ocupa aproximadamente 450 Kb (Trucco Boggione, 2016). El gen *RHD* codifica el antígeno D y su ausencia se representa como “d”, y el gen *RHCE* codifica los antígenos C, c, E y e (Daniel, 2013a).

Los dos genes, *RHD* y *RHCE*, están a una distancia de unos 30kb y presentan una orientación opuesta, enfrentándose por sus extremos 3', es decir, el gen *RHD* está ubicado en posición 5' con respecto al gen *RHCE* (5' - *RHD*-3' - 3'-*RHCE*-5') (Figura 1).

Los extremos 3' de los genes están pues separados por un espacio de aproximadamente 30 Kb en donde se localiza un pequeño gen de siete exones llamado *SMP1* (Small Membrane Protein 1), en igual orientación que el gen *RHD* (Trucco Boggione, 2016). Adicionalmente, el gen *RHD* está flanqueado por dos segmentos de ADN, denominados caja Rhesus 5' y caja Rhesus 3' con una longitud de aproximadamente 9 Kb, las cuales tienen un 98,6% de identidad de secuencia y se encuentran en idéntica orientación (McGeoch *et al.*,1992; Okuda *et al.*, 1999; Trucco Boggione, 2016) (Figura 1).

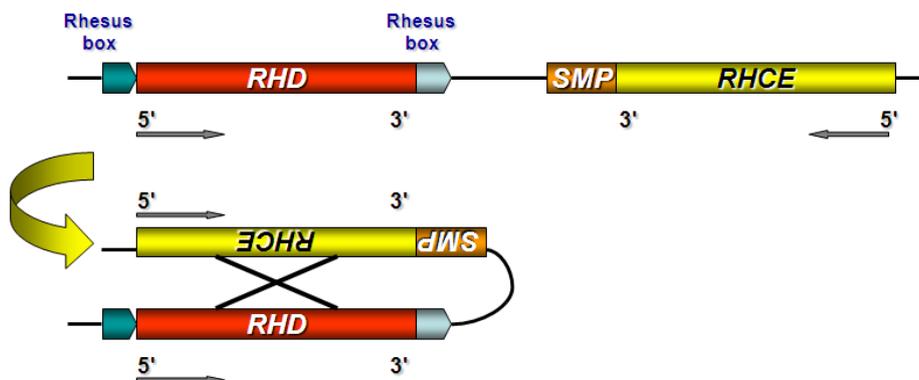


Figura 1. Esquema genes parálogos *RHD* y *RHCE*. (Imagen tomada de Daniels G. Human Blood Groups. 3rd edition ed: Blackwell Science; 182-258; 2013).

## Introducción

El gen *RHCE* posee cuatro formas alélicas más comunes denominadas *RHCE\*ce*, *RHCE\*Ce*, *RHCE\*cE* y *RHCE\*CE*, responsables de los distintos fenotipos Rh (Trucco Boggione, 2016).

Los principales polimorfismos para C/c y E/e se asocian a sustituciones de aminoácidos en el segundo y cuarto dominio extracelular de la proteína RhCE, respectivamente; el antígeno “C” está determinado por la presencia del aminoácido Ser (serina) en posición 103 de la proteína, mientras que el antígeno “c” está determinado por la presencia de Pro (prolina) en la posición 103. El antígeno “E” está determinado también por Pro en la posición 226, mientras que el antígeno “e” está determinado por la presencia de Ala (alanina) en la misma posición de la proteína (Huang *et al.*, 2000; Okuda *et al.*, 2000; Le Van Kim *et al.*, 2005).

Esta similitud de secuencia es debida a que los genes *RHCE* y *RHD* surgieron de la duplicación de un gen ancestral común (Avent, 2000; Huang *et al.*, 2000; Avent, 2001); se puede observar que ambos están compuestos por 10 exones de aproximadamente 69 Kb de ADN cada uno y presentan más de un 93.8% de identidad de secuencia en sus secuencias nucleotídicas codificantes (Wagner *et al.* 2000; Wagner *et al.* 2002).

Como consecuencia de esta similitud de secuencia, se generan procesos de conversión génica que producen numerosos reordenamientos entre ambos genes, lo que origina genes *RH* híbridos. Estos cambios son los responsables principales de la gran diversidad de los antígenos clínicamente relevantes en la compatibilidad sanguínea (Credidio *et al.* 2001; Wagner *et al.* 2001). Como ejemplo, el origen de un alelo con dos copias de *RHD* es el alelo Ce de *RHCE*. El exón 2 del alelo C de *RHCE* es idéntico al exón 2 de *RHD*, incluso en la posición que codifica el antígeno C (Simsek *et al.*, 1994; Carritt *et al.*, 1997), lo que sugiere que el alelo Ce surgió como resultado del intercambio no recíproco de secuencias entre *RHD* en el alelo ce de *RHCE* (Carritt *et al.*, 1997). Otro ejemplo es el descrito por Nuttle *et al.* (2013), en el que mediante la duplicación segmental de 9kb anteriormente mencionada (Rhesus Box), cuyas dos copias flanquean el gen *RHD*, se produce una recombinación no homóloga (NAHR) que resulta en una delección y un aduplicación del gen *RDH* en los individuos de HapMap NA20814 y NA19204 mediante Molecular Inversion Probes (MIPs).

Además, la delección del gen *RHD*, responsable del fenotipo D negativo, parece haber surgido por el entrecruzamiento desigual (recombinación no homóloga) de las cajas Rhesus entre dos haplotipos *RH* mal alineados en “trans”, dando lugar a una caja Rhesus híbrida (**Figura 2**) (Wagner *et al.*, 2000; Flegel, 2011; Trucco Boggione, 2016). Así, los individuos con el fenotipo D negativo resultan homocigotas para esta delección.

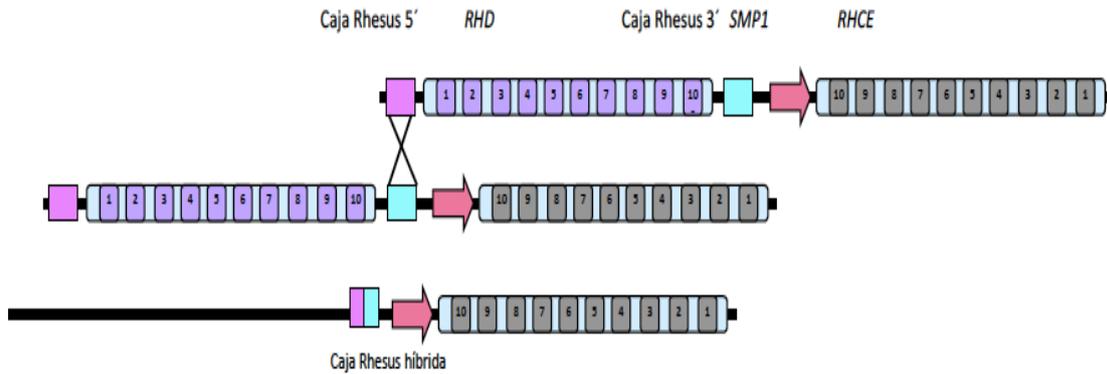


Figura 2. Deleción del gen *RHD*. En la figura se representan el gen *RHD* flanqueado por las cajas Rhesus 5' y 3', el gen *SMP1* y el gen *RHCE* ubicado en orientación opuesta. Un entrecruzamiento desigual entre las Cajas Rhesus 5' y 3' (representadas en forma de rectángulos fucsia y celeste, respectivamente) causa la deleción del gen *RHD* y la generación de una Caja Rhesus híbrida [Imagen tomada de Trucco Boggione C. (2016)].

Los individuos que expresan el antígeno D pueden ser homocigotos (dos copias del mismo alelo *RHD*), hemicigotas (un solo alelo *RHD*) o heterocigotas (dos alelos *RHD* diferentes) para el gen *RHD* (Trucco Boggione, 2016).

## 1.5 Antígenos del sistema Rh: Antígeno D

Los antígenos del sistema Rh se expresan en dos proteínas transmembrana de los eritrocitos: RhD (CD240D) y RhCE (CD240CE). La primera lleva al antígeno D (Rh1) y sus variantes, y la segunda los antígenos C, E, c y e (Rh2 al Rh5) en diferentes combinaciones (CE, cE, Ce y ce) y variantes (Flegel, 2007; Bangham, 2014).

El antígeno D es el más inmunogénico dentro del sistema Rh. Además, de la deleción total o parcial del gen *RHD*, aproximadamente 2% de individuos de origen europeo, y sobre todo los individuos de origen africano (15%), presentan cambios en el gen *RHD* que dan origen a proteínas que no expresan todos los epitopos del antígeno D o no se ensamblan en la membrana eritrocitaria (Wagner *et al.*, 2000; Wagner *et al.*, 2002). Estas variaciones en la expresión del antígeno D originan los fenotipos 'Weak D', 'Partial D' y 'DEL' (D elution) (Westhoff, 2010). Los fenotipos DEL son aquellos cuya proteína habitualmente "normal" se expresa a muy bajos niveles y cuyo gen *RHD* suele estar íntegro, lo que no debe confundirse con un fenotipo D negativo causado por la deleción completa del gen *RHD* (lo que se suele representar como dd o D-).

### A. Fenotipo D

El fenotipo de los eritrocitos humanos se establece en función de la expresión de los antígenos eritrocitarios correspondientes. La asociación que se establece entre fenotipo y su correspondiente genotipo más probable puede establecerse en función de la frecuencia alélica poblacional.

## Introducción

Alrededor del ~85% de los caucásicos presentan un fenotipo D-positivo El fenotipo D negativo presenta un porcentaje inferior, siendo en caucásicos donde este fenotipo minoritario es más frecuente con un ~15%, seguido por africanos ~3-7% y en las personas del Este asiático, con alrededor del ~1%.

Para conocer el genotipo frecuente en cada población es importante determinar o inferir el haplotipo más probable. La prevalencia de los haplotipos Rh por grupo poblacional se muestra en la **Tabla 2**. Como ejemplo, si el fenotipo de los glóbulos rojos de un paciente es D+ C- c+ E- e+ y el paciente es euroamericano, el genotipo (combinación de haplotipos) más probable sería Dce/dce; sin embargo, si el paciente es afroamericano (africano), lo más probable es que sea Dce/Dce porque en afroamericanos la ocurrencia del haplotipo Dce es mayor (44%) que la del haplotipo ce (26%) (Daniels, 2013a).

El haplotipo Rh más común en caucásicos (42%), nativos americanos (44%), y asiáticos (72%) es DCE, mientras que en africanos subsaharianos (59%) es Dce.

**Tabla 2. Frecuencia (en %) de los haplotipos Rh en los tres principales grupos poblaciones (caucásicos, africanos, asiáticos). Tabla adaptada de Daniels G. Human Blood Groups. Chapter 5.**

Haplotipo	Frecuencias		
	Caucásicos	Africanos	Asiáticos
CDE			
<i>DCe</i>	0,4205	0,0602	0,7298
<i>dce</i>	0,3886	0,2028	0,0232
<i>ḡcE</i>	0,1411	0,1151	0,187
<i>Dce</i>	0,0257	0,5908	0,0334
<i>dcE</i>	0,0119	0	0
<i>dCe</i>	0,0098	0,0311	0,0189
<i>DCE</i>	0,0024	0	0,0041
<i>dCE</i>	0	0	0,0036

### B. Fenotipo D variante

Antes de comenzar a explicar los distintos fenotipos D variantes, hay que entender qué significa el término “D variante”.

En los años 50-60 se desarrolló el concepto de **mosaico** de piezas para el antígeno D normal, de tal manera que se definen las variantes del antígeno D normal como aquellos mosaicos que carecen de algunas de dichas piezas. Así, una persona cuyo antígeno D carece de algunas piezas del mosaico y ha sido inmunizada por D normal puede producir un anticuerpo contra las

## Introducción

partes (piezas) que le faltan; un anticuerpo que, en la mayoría de las pruebas de rutina, se comportará como anti-D.

En la década de 1980, con la producción de anticuerpos monoclonales humanos contra el antígeno D, el concepto del mosaico se reemplazó por el concepto de **epítomos D**. Un epítopo o determinante antigénico, es el sitio o porción inmunodominante de un antígeno, a través del cual se une con un anticuerpo o receptor de una célula del sistema inmune (Vega Robledo, 2009).

Existen variantes **cualitativas (Partial D)** y **cuantitativas (Weak D)** dependiendo de la expresión del antígeno en la membrana de los eritocitos. Se diferencian en que las cualitativas presentan una estructura alterada de la proteína RhD, mientras que las cuantitativas presentan una expresión reducida de antígenos D en los glóbulos rojos (Daniels, 2013b). En este sentido, los individuos portadores de variantes cualitativas, son susceptibles de desarrollar una aloinmunización hacia los epítomos ausentes del antígeno D, produciendo anticuerpos anti-D; mientras que los portadores de las variables cuantitativas no se encuentran en riesgo de aloinmunización (Daniels, 2013b; Sandler *et al.*, 2015; Trucco Boggione, 2016).

En cualquier caso, resulta de interés notar que la tipificación serológica de rutina de Rh D no puede distinguir entre subtipos D débiles (variantes cuantitativas) o varios fenotipos D parciales (variantes cualitativas) (Flegel *et al.* 2014; Sandler *et al.* 2015).

### B.1) Fenotipo D parcial ('Partial D')

---

El fenotipo D parcial ocurre en menos del 1% de la población europea. Las bases moleculares que explican este fenotipo pueden ser de tres tipos: 1: alelos híbridos *RHD/RHCE*, 2: mutaciones puntuales en los segmentos extracelulares de la proteína y 3: mutaciones puntuales o mutaciones puntuales dispersas, es decir, múltiples mutaciones ubicadas en diferentes regiones de la proteína RhD lo que puede originar una expresión alterada su antígeno (Flegel *et al.*, 2002, Muñiz *et al.*, 2012a).

El tipo 1: alelos híbridos *RHD/RHCE*: su base molecular principal es la conversión génica, entre el gen *RHD* y *RHCE* lo que origina alelos híbridos *RHD-CE-D* (Dean, 2005). La estructura en tándem y la orientación en direcciones opuestas de los genes *RHD* y *RHCE* facilita las recombinaciones genéticas entre ellos y dan lugar a alelos híbridos de tipo *RHD-CE-D* o *RHCE-D-CE* (Muñiz *et al.*, 2012a).

Estos eventos de conversión génica producen no sólo la pérdida o sustitución de exones completos sino, por consiguiente, la pérdida o sustitución también de aminoácidos localizados en los dominios extracelulares de la proteína RhD lo que modifica la estructura del antígeno D (Avent *et al.*, 2000; Westhoff *et al.*, 2016). Se origina así una proteína quimérica suficientemente

## Introducción

similar para insertarse correctamente en la membrana de los glóbulos rojos, pero carente de varios epítomos encontrados en la proteína RhD completa (Dean, 2005). Además, también se pueden producir nuevos epítomos (Rouillac *et al.*, 1995; Wagner *et al.*, 2004).

La variedad de fenotipos D parciales están definidos por sus diferentes epítomos D en la superficie externa de la membrana de los glóbulos rojos. Se han descrito más de 30 fenotipos parciales D diferentes. (Körmöczsi *et al.*, 2004).

Desde un punto de vista clínico, es esencial que los **donantes 'Partial D' se etiqueten como Rh D positivos**, y por otro lado los **pacientes**, que están en riesgo de generar aloinmunización anti-D tras la exposición un antígeno D (Körmöczsi *et al.*, 2004), **deben tratarse como D negativos**.

### B.2) Fenotipo D débil ('Weak D')

---

Las variantes *cuantitativas* del antígeno D (weak D) expresan un número menor de sitios antigénicos por eritrocito (<5000) comparado con un fenotipo D positivo normal (Flegel, 2006; Flegel 2011; Daniels, 2013b; Trucco Boggione, 2016).

El fenotipo weak D es el más común de los fenotipos poco frecuentes asociados al sistema Rh en la población de origen europeo, con una frecuencia de entre el 0,2 y el 1% (Haer-Wigman *et al.* 2013; Wagner *et al.* 2009) y está asociado a un haplotipo DCe o DcE (inusual) (Brecher, 2005). En la población africana, sin embargo, es bastante común y suele asociarse al haplotipo Dce (Brecher, 2005).

La base molecular de la expresión débil de D es heterogénea, pero todos los ejemplos publicados hasta ahora obedecen a mutaciones puntuales en algunos exones del gen *RHD* (Westhoff *et al.*, 2016). Estas mutaciones puntuales se localizan en la región transmembrana o intracelular. Aunque esta localización, en general, no resulta inmunogénica, puede suponer una dificultad en la inserción de la proteína en la membrana del hematíe originando una expresión disminuida de antígeno D (Wagner *et al.*, 1999; Flegel *et al.*, 2007; Muñiz *et al.*, 2012a; Sandler *et al.*, 2017). En la mayoría de los casos, esta es la causa más común en personas de ascendencia europea.

Otra causa de la expresión debilitada del antígeno D está basada en un efecto de posición, es decir, modificaciones en la expresión de un determinado antígeno como consecuencia de la presencia de un alelo homólogo que codifica otro antígeno sólo cuando está en posición *cis* o *trans* respecto al primero (Brecher, 2005; Trucco Boggione, 2016). Por ejemplo, el llamado efecto *trans*, describe la expresión deprimida del antígeno D, debido a la presencia del gen para el antígeno C en el cromosoma homólogo. Así, los eritrocitos de un individuo DCe/dce expresan más antígeno D que las células Dce/dCe que presentan un efecto supresor ejercido por *RHC* en

## Introducción

posición trans a *RHD* en el cromosoma homólogo (Westhoff, 2007). Esta situación también es conocida como 'D-débil' o 'Du de alto grado', debido a la reacción débil de aglutinación que presentan las células con algunos tipos de reactivos anti-D monoclonales (Rouillac *et al.*, 1996). Sin embargo, la expresión weak D se encuentra principalmente asociada a individuos hemicigotos, con un único alelo *RHD* que además tiene una alteración genética.

Y, por último, también se han descrito sustituciones de un solo nucleótido en la región promotora causan una reducción en la expresión del alelo lo que origina que los antígenos produzcan reacciones débiles con algunos antisueros monoclonales en la rutina clínica. Existen 3 variantes descritas *RHce* (*5'-UTR-10C>T*) (Bugert *et al.*, 2009), *RHD\*5'-UTR-115C* y *5'-UTR-83T* (Fennell *et al.*, 2017).

La determinación molecular de los distintos alelos permitió clasificar los tipos de Weak según la mutación responsable de la expresión disminuida del antígeno D (Flegel *et al.*, 2002). Más de 147 tipos de weak D están incluidos en la base de datos de Rhesus [<http://rhesusbase.info/>] (Sandler *et al.*, 2017). Es importante destacar que los tipos weak D tipo 1 (*RHD: c. 809 T>G*), weak D tipo 2 (*RHD: c. 1154 G>C*) y weak D tipo 3 (*RHD: c. 8 C>G*) son los más comunes entre los subtipos D débiles, constituyendo el 90-95% de los casos encontrados en europeos (Flegel, 2011) (**Tabla 3**).

Tabla 3. Fenotipos Weak D más frecuentes.

Fenotipo	Cambio nucleotídico	Cambio aminoacídico	Exón RHD	Localización
Weak D type 1	<i>RHD:c.809T&gt;G</i>	<i>p.Val270Gly</i>	6	Transmembrana
Weak D type 2	<i>RHD:c.1154G&gt;C</i>	<i>p.Gly385Ala</i>	9	Transmembrana
Weak D type 3	<i>RHD:c.8C&gt;G</i>	<i>p.Ser3Cys</i>	1	Intracelular

Los **pacientes** con delección de un alelo D y presencia de weak D tipo 1, 2 y 3 no son susceptibles de desarrollar respuesta inmunogénica, por lo tanto, **pueden** considerarse a efectos transfusionales como si fueran Rh D positivos, y no precisando de prácticas clínicas especiales en este sentido (Noizat-Pirenne *et al.* 2007; Westhoff *et al.*, 2016) y, por tanto, transfundirles sangre Rh positiva sin causarles ninguna reacción transfusional.

En el caso de **donantes** weak D tipo 1, 2 o 3, éstos **deben** considerarse como D+ y, por lo tanto, potencialmente inmunogénicos. Cada tipo de weak D tiene una expresión distinta de antígeno D en los eritrocitos que hace que la detección serológica antígeno-anticuerpo pueda ser variable (Brecher, 2005; Sandler *et al.*, 2015).

El algoritmo de decisión en pacientes con serología D débil o no concluyente se muestra en la **Figura 3**.

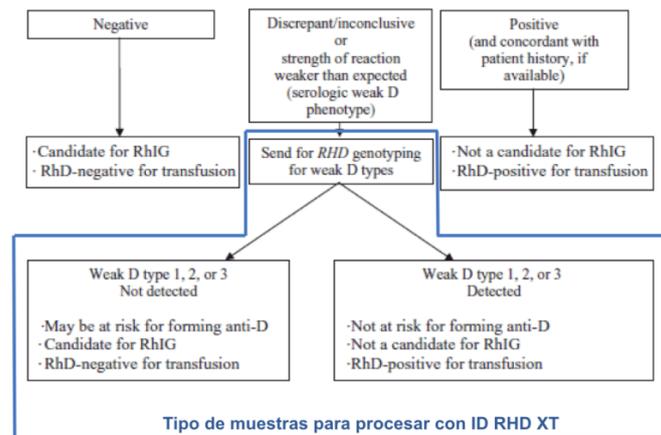


Figura 3. Clasificación realizada por Sandler *et al* (2015) del tipo de muestras cuyo resultado serológico es weak D y deben resolverse mediante genotipado de *RHD*. El test de genotipado discrimina los genotipos *weak D* tipo 1, 2 y 3 del resto de genotipos para determinar, en el caso de embarazadas, si son candidatas a la profilaxis con anti-D inmunoglobulina (RhIG) y en el caso de pacientes si están en riesgo de aloinmunización. Las muestras que se van a poder genotipar con ID RHD XT están enmarcadas con una línea azul.

Desde el punto de vista serológico, se distinguen dos implicaciones de los antígenos weak D. La primera hace referencia a la expresión débil del antígeno o la ausencia de determinadas regiones imprescindibles para que los anticuerpos empleados en los métodos estándar lleven a cabo su reconocimiento. La segunda es consecuencia de las limitaciones propias del mercado, que no puede ofrecer anticuerpos comerciales frente a todos los antígenos sanguíneos.

Un ejemplo es el Weak D tipo 2, que presenta una cantidad muy reducida de antígeno D, y puede no detectarse con algunos reactivos comerciales anti-D o con algunos tests. Esto implica discrepancias en la tipificación de D, es decir, el paciente podría ser D+ o D- en distintos centros o incluso en el mismo centro por el uso de reactivos de distintos fabricantes o por cambiar la técnica de tipado (Daniels 2013a).

A la vista de las implicaciones para la práctica transfusional hemos incluido en este trabajo como variantes detectas por el test genético que proponemos, denominado ID RHD XT, las variantes Weak más frecuentes: weak D tipo 1 (*RHD*: c. 809 T>G), weak D tipo 2 (*RHD*: c. 1154 G>C) y weak D tipo 3 (*RHD*: c. 8 C>G)

## C. Fenotipo DEL

El fenotipo DEL presenta trazas del antígeno D en el glóbulo rojo que sólo pueden detectarse mediante la técnica adsorción-elución, por eso se le considera el positivo conocido más débil en el sistema de grupos sanguíneos Rh (Li *et al.*, 2009). Un D positivo homocigoto normal tiene alrededor de 30.000 sitios antigénicos D por célula (Rodríguez-Moyado *et al.*, 2004), mientras que en un DEL (*D elution*) presenta aproximadamente 20-40 sitios por célula (Körmöczsi *et al.*, 2005) debido que su único alelo D está alterado. A pesar de esta baja cantidad si se transfunde

sangre DEL a individuos D negativos, éstos están en riesgo de desarrollar aloinmunización anti-D (Nuchnoi *et al.*, 2014).

Las variantes DEL se caracterizan por presentar una expresión mínima del antígeno D en la membrana eritrocitaria (Trucco Boggione, 2016). Son muy comunes en Asia oriental (China y Japón), donde alrededor del 10-30% de los individuos aparentemente D negativo son fenotipos DEL (Li *et al.*, 2009). También se puede encontrar en población de origen europea, pero la frecuencia de fenotipo es muy baja 0.1% (Gardener *et al.*, 2012).

Los mecanismos que originan un fenotipo DEL son muy diversos como: *splice-site mutation* (alteración en la secuencia de ADN que ocurre en el límite de un exón y un intrón), lo que hace que el ARNm inmaduro no se procese eficientemente a ARNm maduro. En unos pocos casos se origina por una *missense mutation* (sustitución de un solo par de bases alterando el código genético lo que produce un aminoácido diferente al habitual), o porque se produce una variante en el promotor que hace que el gen no se transcriba eficientemente, pero la proteína que se expresa sigue siendo “normal”. Otro origen es el denominado *frameshift mutation* (inserción o eliminación de un número de pares de bases, no múltiplo de tres, cuya consecuencia es alterar la pauta de lectura generando una proteína estructuralmente (y funcionalmente) anómala, aunque con el gen *RHD* básicamente íntegro; y por último, a *long deletion* (una delección considerable) del gen *RHD* (Wagner *et al.*, 2001, Wagner *et al.*, 2005).

En poblaciones asiáticas el alelo *RHD* (*1227G>A*) es el responsable de más del 95% de los portadores de un fenotipo DEL (Trucco Boggione, 2016), por lo que se considera como marcador genético de este grupo poblacional (Chen *et al.*, 2004). Este cambio nucleotídico es generado por un *splice-site* en el exón 9 del gen *RHD*. El polimorfismo está localizado en el sitio de corte y empalme ubicado en el límite exón 9-intrón 9, generando un transcrito de ARNm que carece del exón 9 de referencia (Chen *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2009; Trucco Boggione, 2016).

Otra variante que genera un fenotipo DEL es *RHD(IVS3+1G>A)*, la cual ha sido identificada únicamente en poblaciones de origen europeo (Polin *et al.*, 2009).

---

### D. Fenotipo D negativo

#### D.1) Delección total o parcial del gen *RHD*

---

El fenotipo Rh D negativo más común es consecuencia de una delección (total o parcial) del gen *RHD*. Es una condición homocigota con la ausencia de ambos alelos del gen. El punto de ruptura se localiza en la región de las cajas del Rh (1463 pb) (Baptista-Gonzalez, 2005). Frecuentemente forma parte de un haplotipo junto con el alelo *RHCE\*ce* (Wagner *et al.*, 2000; Wagner *et al.*, 2001).

## Introducción

La delección completa del gen (la pérdida de las copias) presenta una frecuencia observada en población de origen europeo del ~15%, mientras que en africanos sub-saharianos es del ~5-8%, y se considera un tipo de sangre poco frecuente y no rutinaria en asiáticos (< 1%) (Reid *et al.*, 2004; Connie 2010).

Además existen numerosas variantes alélicas que originan fenotipos D negativos cuyas proteínas RhD no expresan los epítomos del antígeno D o no se ensamblan en la membrana eritrocitaria (Gowland *et al.*, 2014; Trucco Boggione, 2016). A continuación, en los apartados **D.2** y **D.3**, se detallan las variantes D negativas que se han incluido en este proyecto y que forman parte del test genético desarrollado (D.2 “Alelo *RHD\*Pseudogen* o *RHD\*ψ*” y apartado D.3 “Alelo híbrido *RHD\*DIIIa-CE (3-7)-D*”). Existe un gran interés clínico en la rutina transfusional en clasificar correctamente este tipo de fenotipos D negativos, causados frecuentemente por las variantes descritas previamente (*RHD deletion*, *RHD\*ψ* y *RHD\*DIIIa-CE (3-7)-D*), incluidas en el desarrollo del test ID RHD XT, objetivo de este proyecto.

### D.2) Alelo *RHD\*Pseudogen* o *RHD\*ψ*

---

El alelo *RHD\*Pseudogen* o *RHD\*ψ* contiene un inserto de 37 pares de bases (pb) en la región intrón 3–exón 4 que produce un cambio en la pauta de lectura que introduce un codón stop en la posición 210. El inserto es una duplicación de una secuencia que comprende los extremos 3' del intrón 3 y 5' del exón 4 del gen *RHD*. Además, se encontraron mutaciones puntuales de cambio de sentido en los exones 4 (*c.609G>A*), 5 (*c.654G>C*, *c.667T>G*, *c.674C>T*) y 6 (*c.807T>G*) (Trucco Boggione, 2016). El haplotipo más común es *RHDψ-RHCE\*ce* (Singleton *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2002). En un estudio realizado en población africana con individuos D negativos (82), se determinó que la frecuencia del total de individuos para la variante *RHD\*Pseudogen* (*RHD\*ψ*) estaba presente con un 66% (Singleton *et al.*, 2000; Wagner *et al.* 2000; Szulman *et al.* 2012; Khosroshahi *et al.*, 2019).

### D.3) Alelo Híbrido *RHD\*DIIIa-CE (3-7)-D*

---

Esta variante está formada por los exones 1, 2, parte del 3, 8, 9 y 10 pertenecientes al gen *RHD*, y el fragmento restante del exón 3 y los exones del 4 al 7 del gen *RHCE* (Trucco Boggione, 2016). Además, también presentan las sustituciones nucleotídicas *c.733C>G* y *c.1006G>T* y segregan junto con un alelo *RHCE\*ce* (Figura 4). En el mismo estudio, anteriormente citado, se determinó que la frecuencia del total de individuos para la variante *RHD\*DIIIa-CE (3-7)-D* estaba presente en el 15% y tan sólo un 18% carecía completamente del gen *RHD* (Singleton *et al.*, 2000; Wagner *et al.* 2000; Szulman *et al.* 2012; Khosroshahi *et al.*, 2019).

## Introducción

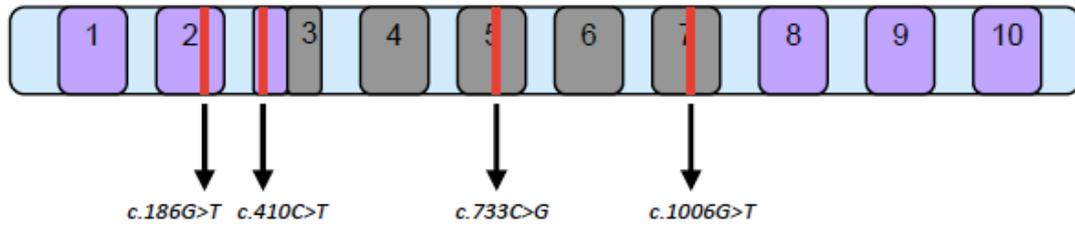


Figura 4. Estructura molecular del alelo *RHD\*DIIIa-CE*. En magenta se indican los exones provenientes del gen *RHD*, mientras que en gris se señalan los provenientes del gen *RHCE*. Las líneas verticales rojas indican los SNPs característicos de esta variante [Imagen tomada de Trucco Boggione C. (2016)].

Todos estos fenotipos D negativos están incluidos en el test de genotipado desarrollado en este proyecto.

### 2. Sistema plaquetario humano (Human Platelet Antigens (HPA))

Las plaquetas, al igual que el resto de componentes sanguíneos, presentan en la superficie externa de su membrana estructuras polimórficas e inmunogénicas. Estas estructuras genéticamente determinadas y localizadas en las proteínas, glicoproteínas y glicolípidos, pueden asimismo causar aloinmunización durante el embarazo, la transfusión sanguínea o el trasplante.

---

#### 2.1 Nomenclatura de los HPAs

Históricamente, los antígenos plaquetarios específicos se denominaban con el nombre de los pacientes sensibilizados en los que fue identificado el anticuerpo. Esta nomenclatura fue complicándose con el paso de los años, especialmente cuando un nuevo antígeno era identificado simultáneamente por más de un grupo de investigadores, lo que originaba una controversia sobre la paternidad del descubrimiento y la denominación que debía emplearse.

A la vista de esta problemática, en 1990 Von Dem Borne y Décary propusieron un sistema simplificado llamado Human Platelet Antigens (HPA), revisado posteriormente por en 1998 por Santoso y Kiefel, y recientemente (2003) por Metcalfe *et al.* Según esta nomenclatura, un antígeno plaquetario específico es denominado antígeno plaquetario humano (HPA) solo cuando sus bases moleculares son conocidas.

A su vez, los HPAs son agrupados en sistemas basados en la existencia de aloanticuerpos que definen tanto al antígeno tético como al antitético, es decir, antígenos producidos por diferentes alelos de un determinado *locus*.

Los sistemas HPA son designados cronológicamente HPA-1, HPA-2, HPA-3, etc. de acuerdo con el orden de la fecha de su descubrimiento, y se designan alfabéticamente en orden según su frecuencia (de alta a baja) en la población estudiada, nombrando al de mayor frecuencia como "a" y al de frecuencia más baja como "b". Una designación "w" es agregada después del nombre del antígeno si aún no se ha identificado un aloanticuerpo dirigido contra el antígeno antitético (Muñiz *et al.*, 2012b; Quintero, 2014).

---

#### 2.2 Bases moleculares de HPA

Actualmente se conoce la base molecular de los diferentes sistemas y antígenos plaquetarios. La mayoría de alelos pertenecientes a los diferentes sistemas son polimorfismos debidos a una mutación de tipo puntual, con cambio de sentido, en la secuencia del DNA codificante, es decir, en un cambio de base que comporta a su vez un cambio de aminoácido (aa) en la secuencia de la proteína expresada a partir de ese alelo.

## Introducción

Se conocen hasta 27 aloantígenos plaquetarios específicos que han sido definidos por sus correspondientes anticuerpos identificados en diferentes procesos clínicos de etiopatogenia inmune. Doce de estos antígenos se hallan agrupados en seis sistemas bialélicos que van del HPA-1 al HPA-5 más el sistema HPA15. Los 15 antígenos restantes no tienen un antígeno antitético, probablemente porque al tratarse de antígenos de baja frecuencia la posibilidad de encontrar individuos homocigotos para el antígeno antitético susceptibles de inmunizarse es muy remota.

En los sistemas HPA-1 al HPA-5 existe un antígeno de alta frecuencia que es denominado “a” y otro de baja frecuencia que es denominado “b”, a excepción, del sistema HPA-15 en el que las frecuencias de ambos antígenos son similares. La frecuencia para cada uno de estos antígenos varía según la población de estudio.

La mayor parte de los aloantígenos plaquetarios identificados hasta el momento residen en alguno de los complejos glicoproteicos IIb/IIIa, Ib/IX, Ia/IIa o en la proteína CD109. La glicoproteína (GP) IIIa (CD61) es la más polimórfica y da cabida a la mayoría de aloantígenos plaquetarios. Junto con la GP IIb (CD41) constituye el complejo heterodimérico IIb-IIIa del que existen de 50.000 a 80.000 copias/plaqueta, y que pertenece a la familia de moléculas conocidas como integrinas (integrina  $\beta 3\alpha IIb$ ). La GP IIb (CD41) y la GPIIIa (CD61) están codificados por los genes *ITGA2B* e *ITGB3*, respectivamente localizados en el brazo largo del cromosoma 17 (bandas q21-23) a lo largo de un segmento de 260 kb (Curtis *et al.*, 2014). En la GP IIIa residen los polimorfismos correspondientes a los sistemas HPA-1 (residuo 33), HPA-4 (residuo 143), HPA-6w (residuo 489), HPA-7w (residuo 407), HPA-8w (residuo 633), HPA-10w (residuo 62), HPA-11w (residuo 633), HPA-14w (611 del), HPA-16w (residuo 140), HPA-17w (residuo 195), HPA-19w (residuo 137) y HPA-21w (residuo 628). En la GPIIb se localizan los polimorfismos de los sistemas HPA-3 (residuo 843), HPA-9w (residuo 837) y HPA-20w (residuo 1949) (Muñiz *et al.*, 2012b).

---

### A. HPA-1

El antígeno plaquetario humano HPA-1 es uno de los polimorfismos más estudiados y presenta dos isoformas alélicas, a y b.

Los anticuerpos HPA-1a son los aloanticuerpos plaquetarios más frecuentemente detectados en la práctica clínica, y son los causantes del 85% de los casos de trombocitopenia aloinmune del feto y del neonato (TAIFN) confirmados serológicamente (Curtis *et al.*, 2014).

La frecuencia del antígeno HPA-1b en comparación a HPA-1a, es comúnmente más baja en poblaciones caucásicas, y los individuos con el tipo de plaquetas HPA-1b/1b son aquellos que pueden producir anticuerpos contra HPA-1a (Curtis *et al.*, 2014). En el alelo HPA-1b, una citosina

se sustituye por timidina en el exón 2, lo que se traduce fenotípicamente en la sustitución de prolina por leucina en la posición 33 de la GPIIIa madura (Böttiger *et al.*, 2000).

### 3. Importancia clínica de los sistemas sanguíneos Rh y HPA

#### 3.1 Aloinmunización

En la respuesta inmunológica se puede generar aloanticuerpos o autoanticuerpos (Sapatnekar *et al.*, 2014). Los **autoanticuerpos** son aquellos que reaccionan contra los antígenos propios. La mayoría de estos anticuerpos parecen ser inespecíficos (Avent *et al.*, 2000). Los **aloanticuerpos, en cambio**, se producen cuando una persona ha estado en expuesta, a través de una transfusión de sangre o por un embarazo, principalmente a hematíes, pero sin descartar las plaquetas, de otra persona (Jungbauer *et al.*, 2012). La incidencia de aloinmunización durante el embarazo es aproximadamente del 0.24% (Heddle *et al.*, 1993) mientras que en pacientes pre-transfundidos puede llegar al 3-10% (Hendrickson *et al.*, 2016).

Existen algunos factores descritos implicados en el desencadenamiento de esta respuesta inmunológica, como son el número de embarazos, el número de transfusiones, el diagnóstico clínico, el tratamiento del paciente, los factores genéticos, o las diferencias poblacionales entre donante y receptor (Villa *et al.* 2011).

La mayor parte de la información sobre la aloinmunización contra antígenos eritrocitarios proviene del estudio de la enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN) y de individuos politransfundidos. Los individuos pueden desarrollar anticuerpos únicos o múltiples, y en ambos casos, la especificidad para el sistema Rh es la más frecuente (Alfonso Valdés *et al.*, 2006).

En los pacientes politransfundidos aumenta el riesgo de aloinmunización según aumenta el número de transfusiones, algo que se ha detectado entre el 1-9% de los individuos (Villa *et al.* 2011; Jungbauer *et al.*, 2012). Otros pacientes, donde la tasa de aloinmunización es muy alta (hasta un 40-50% de dichos pacientes serán aloinmunizados y formarán múltiples aloanticuerpos) son los individuos con anemia de células falciformes (Balbuena-Merle *et al.*, 2019). Otro ejemplo de estas tasas elevadas de aloinmunización, con frecuencia alrededor del 30%, son los pacientes con talasemia, enfermedad hereditaria donde se produce una ausencia o reducción de la expresión de las cadenas  $\alpha$  o  $\beta$  globina (subunidad proteica de la hemoglobina) dando lugar a las alfa o beta talasemia, respectivamente, (Jungbauer *et al.*, 2012). Desde el punto de vista molecular, las talasemias obedecen a mutaciones de genes de la globina que, de alguna forma, alteran el mecanismo de síntesis. En la  $\alpha$ -talasemia, tales mutaciones consisten en deleciones de parte o todo un gen, y en otras, como en la  $\beta$ -talasemia, a sustituciones de un nucleótido en los intrones (IVS), en la vecindad de éstos, en los exones, que alteran la transcripción o la maduración del RNAm y dificultan o impiden la traducción (Malcorra, 2001).

En el caso de la aloinmunización plaquetaria los antígenos específicos plaquetarios desempeñan un papel crucial en la trombocitopenia fetal/neonatal aloinmune (TFNA), explicada en el apartado 3.3, así como en la denominada "púrpura postransfusional" (PPT) (Muñiz *et al.*, 2012b). La PPT es una complicación muy rara en la que el recuento de plaquetas desciende rápidamente de 4 a 14 días después de una transfusión de eritrocitos. Casi todos los pacientes son mujeres multíparas que típicamente recibieron transfusión de glóbulos rojos durante un procedimiento quirúrgico. La etiología exacta es incierta. Sin embargo, la hipótesis más aceptada es que un paciente que es negativo para el antígeno plaquetario humano 1a (HPA1a) desarrolla aloanticuerpos debido a la exposición al antígeno HPA1a del feto durante el embarazo (Vázquez *et al.*, 2002).

### 3.2 Sistema Rh: Enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN) o eritroblastosis

#### A. Descripción

La enfermedad hemolítica del feto y el recién nacido (EHRN), también llamada "eritroblastosis fetal", se caracteriza por presentar la mayor tasa de destrucción de glóbulos rojos. Según la etiología, la hemólisis en recién nacidos puede ser mediada por inmunidad o por causas no inmunes. La hemólisis inmunomediada debido a la incompatibilidad del grupo sanguíneo entre la madre y el feto es la causa principal de EHRN (Das, 2019). Las causas no inmunes incluyen  $\alpha$ -talasemia, defectos en la membrana eritrocitaria o enzimáticos.

La eritroblastosis fetal por causas inmunes es un tipo de anemia hemolítica que se produce como consecuencia de la incompatibilidad entre los antígenos eritrocitarios fetales y maternos. Los hematíes del feto son destruidos por el sistema retículo-endotelial fetal después de producirse una reacción antígeno-anticuerpo (Rodríguez *et al.*, 2004). El principal antígeno eritrocitario responsable de esta aloinmunización (también denominada isoimmunización) es el antígeno D del sistema sanguíneo Rh (Borrell, 2014). Los anticuerpos de especificidad anti-Rh(D) se originan como consecuencia de la destrucción de los hematíes fetales inducida por la acción de aloanticuerpos IgG específicos derivados de la madre que atraviesan la placenta, y que reaccionan con el antígeno de origen paterno presente sobre los hematíes del feto y ausente de los eritrocitos maternos (Kennedy, 2011).

Aunque existen más de 60 antígenos eritrocitarios diferentes capaces de provocar una respuesta inmune, la morbilidad significativa se asocia principalmente con el antígeno D del grupo Rh (Das, 2019). La prevalencia de anticuerpos de glóbulos rojos que no sean anti-D con capacidad para inducir EHRN es de aproximadamente 1 de cada 500 embarazos (Koelewijn *et al.*, 2008). En resumen, la EHRN se produce mayoritariamente en gestantes con fenotipo RhD negativo cuyo

feto es RhD positivo (Borrell, 2014). A continuación, describiremos el proceso de aloinmunización durante el embarazo.

---

### **B. Aloinmunización durante el embarazo**

En general la aloinmunización puede ser causada por embarazo, transfusión de sangre o trasplante o injerto de tejido / órgano, debido a la diferencia genética entre los individuos (Urbaniak, 2002). En estos casos, al exponerse el tejido/órgano a un antígeno eritrocitario extraño, se activa el sistema inmunitario, que está mediado por linfocitos.

Cuando una embarazada Rh negativa se expone a un antígeno D se generan dos respuestas. Una, la llamada **respuesta primaria**, donde los hematíes fetales pasan a la madre durante el embarazo (20-30%), pero sobre todo durante el parto (70-80%). La sensibilización materna se produce con el paso transplacentario de aproximadamente 0,5-1,5 ml de sangre. Estos antígenos desencadenarán la respuesta primaria, que se caracteriza por la formación de una escasa cantidad de anticuerpos **IgM** que no atraviesan la placenta por su elevado tamaño (Fernández et al., 2000; López de Roux et al., 2000). Los IgM pueden aparecer tan tempranamente como a las 4 semanas después del estímulo; aunque usualmente la respuesta oscila entre 8 y 9 semanas (López de Roux et al., 2000), como consecuencia, que se origine la EHRN en la primera gestación (0,4-2% de todas las EHRN) es muy raro y, en cambio, es más frecuente cuando la mujer está sensibilizada previamente por transfusiones (hasta el 33% de EHRN) (Fernández *et al.*, 2000).

Ocurrida la primaria, basta un pequeño estímulo del mismo antígeno, simplemente con 0,03 mL de sangre D-positiva, ya se desencadena la **respuesta secundaria**. Esta respuesta produce la formación de anticuerpos **IgG**, que pasan fácilmente la barrera placentaria y son los responsables de la destrucción progresiva de los hematíes fetales. La placenta es una barrera natural presente entre la madre y el feto y sólo los anticuerpos IgG pueden atravesar la placenta. Según avanza el embarazo la concentración media de anticuerpos IgG va aumentando en el feto, teniendo a término, una concentración más alta que en la madre. Las subclases de IgG1 y IgG3 son más eficientes en la hemólisis que IgG2 e IgG4, aunque las cuatro clases se transfieren eficientemente a través de la placenta (Sanz et al, 2006).

Estas IgG comienzan a producirse al de 48 horas y su punto máximo lo alcanzan a los 6 días. La destrucción de los hematíes ocurre por dos mecanismos: 1.- activando el sistema del complemento hasta la fase de lisis celular (hemólisis intravascular) y 2.- a través de la unión del anticuerpo anti-D a los receptores Fc de los macrófagos, produciéndose a nivel del bazo la lisis de los eritrocitos (hemólisis extravascular) (Fernández *et al.*, 2000; López de Roux *et al.*, 2000).

Esta respuesta secundaria es más rápida, potente y específica que la primaria (Brinc *et al.*, 2009).

---

### C. Inmunoglobulina anti-D

La prevención de la isoimmunización Rh disminuye la probabilidad de enfermedad hemolítica del recién nacido (eritroblastosis fetal) en un embarazo futuro con un feto D positivo. Así, el riesgo de que una madre RhD negativa pueda ser aloimmunizada por un feto RhD positivo puede reducirse del 16% a menos de 0.1% mediante la administración apropiada de RhIG (Karanth *et al.*, 2013). The American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) recomienda que, independientemente del tipo de sangre fetal, todas las mujeres D negativas reciban RhIG aproximadamente a las 28 semanas de gestación, y nuevamente poco después del parto en el caso de un bebé D positivo. El 92% de las mujeres que desarrollan anticuerpos anti-D durante el embarazo lo hacen en ese tiempo o después de las 28 semanas de gestación (Chilcott *et al.*, 2003).

La inmunoglobulina Rho (D) (RhIG) suprime la formación de anticuerpos anti-D en mujeres D negativas que han estado expuestas a sangre positiva como resultado de un embarazo u otras afecciones obstétricas (aborto, amniocentesis, embarazo ectópico, etc), es decir, se evita la isoimmunización Rh (Grifols, 2018).

---

### 3.3 Sistema HPA: Trombocitopenia fetal o neonatal aloimmune (TFNA)

---

#### A. Descripción

La trombocitopenia fetal/neonatal aloimmune (TFNA) se produce como consecuencia de la destrucción de las plaquetas fetales/neonatales inducida por un aloanticuerpo plaquetario presente en el suero materno y dirigido contra un antígeno plaquetario específico fetal heredado del padre. Se estima que entre 1.000 y 2.000 recién nacidos pueden nacer con esta patología y actualmente se considera que la TFNA es la causa más común de trombocitopenia neonatal grave (< 20.000 plaquetas) con una prevalencia aproximada de 1 entre 2.500 neonatos (Kaplan, 2007; Muñiz *et al.*, 2012b).

La TFNA es una complicación homologable a la enfermedad hemolítica del recién nacido por incompatibilidad Rh (D), pero a diferencia de aquella, aproximadamente un 30%-50% de los casos se producen con la primera gestación (Muñiz *et al.*, 2012b). En la población embarazada de origen europeo, el 2,1% es negativo para HPA-1a, de los cuales el 10% producirá aloanticuerpos contra HPA-1a (1 de cada 500 embarazos), lo que lleva a una trombocitopenia severa en aproximadamente 1 de cada 1.500 embarazos (Winkelhorst *et al.*, 2019).

### 4. Métodos de identificación del fenotipo sanguíneo: inmunohematología

La inmunohematología engloba estudios serológicos, genéticos, bioquímicos y moleculares de antígenos asociados con estructuras de la membrana de las células de la sangre, así como, las propiedades y reacciones de todos los componentes sanguíneos.

Esta área de conocimiento ha permitido el desarrollo de una medicina transfusional que incluye no sólo la transfusión de sangre, sus componentes y derivados, sino también, el estudio de la patogénesis, diagnóstico, prevención y manejo de la inmunización asociada a transfusiones, embarazo y trasplante de órganos.

---

#### 4.1 Métodos serológicos

La serología ha sido durante décadas la técnica empleada para la determinación de los grupos sanguíneos eritrocitarios. Se basa en la capacidad antigénica de los grupos sanguíneos empleando anticuerpos que reconocen e identifican dichos grupos (Daniels, 2013b).

Los anticuerpos de los grupos sanguíneos son de dos tipos:

**Anticuerpos IgG:** constituyen alrededor del 73% de las inmunoglobulinas totales. Por su tamaño, atraviesan con facilidad la placenta, causando la enfermedad EHRN. Los anticuerpos IgG no producen aglutinación de los glóbulos rojos antigénicos suspendidos en solución salina; sólo los recubren y sensibilizan.

**Anticuerpos IgM:** constituyen alrededor del 8% de las inmunoglobulinas totales. Son mucho más grandes que los IgG, por lo que no pueden atravesar la placenta, de manera que no provocan EHRN. Aglutinan con facilidad los glóbulos rojos suspendidos en solución salina y su vida media es de apenas 10 días. Durante las reacciones antígeno-anticuerpo, a menudo activa el complemento (conjunto de moléculas plasmáticas implicadas en distintas cascadas bioquímicas para mejorar la respuesta inmune al activarse como resultado de la interacción antígeno-anticuerpo), causando, más que aglutinación, la hemólisis de los eritrocitos, (García, 2009).

---

#### A. Hemaglutinación

Es el método más común para conocer el fenotipo sanguíneo. Los glóbulos rojos del paciente se testan con antisueros específicos para los antígenos de interés.

## Introducción

Se produce la fijación de los anticuerpos a los antígenos que están en la membrana de los eritrocitos, formando una red que mantiene unidas las células. Este proceso se divide en dos etapas:

**1.- Sensibilización:** los anticuerpos se adhieren físicamente al antígeno específico de la superficie de los glóbulos rojos.

**2.- Aglutinación:** los anticuerpos provocan aglutinación física de las células. Esta etapa sólo se desencadena modificando las condiciones de temperatura, pH, fuerza iónica, etc (García, 2009).

---

### **B. Prueba de antiglobulina o prueba de Coombs**

Las IgG como ya se ha comentado sensibilizan los eritrocitos y no producen aglutinación. En 1945, Coombs y colaboradores describieron una prueba para detectar estos anticuerpos no aglutinantes (Coombs *et al.*, 1945). Es la técnica más utilizada en inmunohematología. Este análisis puede detectar la presencia de anticuerpos en suero que reaccionan con antígenos en la superficie de los glóbulos rojos. Los componentes principales del reactivo antiglobulina son los anticuerpos anti-IgG y anti-C3 (C3d/C3dg); la actividad anti-IgA y anti-IgM no es imprescindible pero deseable. La presencia de estos anticuerpos permite la detección de autoanticuerpos IgM (no aglutinantes) e IgA en la prueba de antiglobulina directa (PAD) para el diagnóstico de la anemia hemolítica autoinmune (AHAI) que, en ocasiones, por las dificultades en su detección, están involucrados en la etiología de la AHAH "Coombs negativa". La prueba de Coombs detecta, como mínimo, entre 200 y 500 moléculas de IgG por hematíe (Bencomo-Hernández *et al.*, 2010).

Hay dos tipos distintos de la prueba de Coombs: el directo y el indirecto.

#### **B.1) Prueba de antiglobulina directa**

---

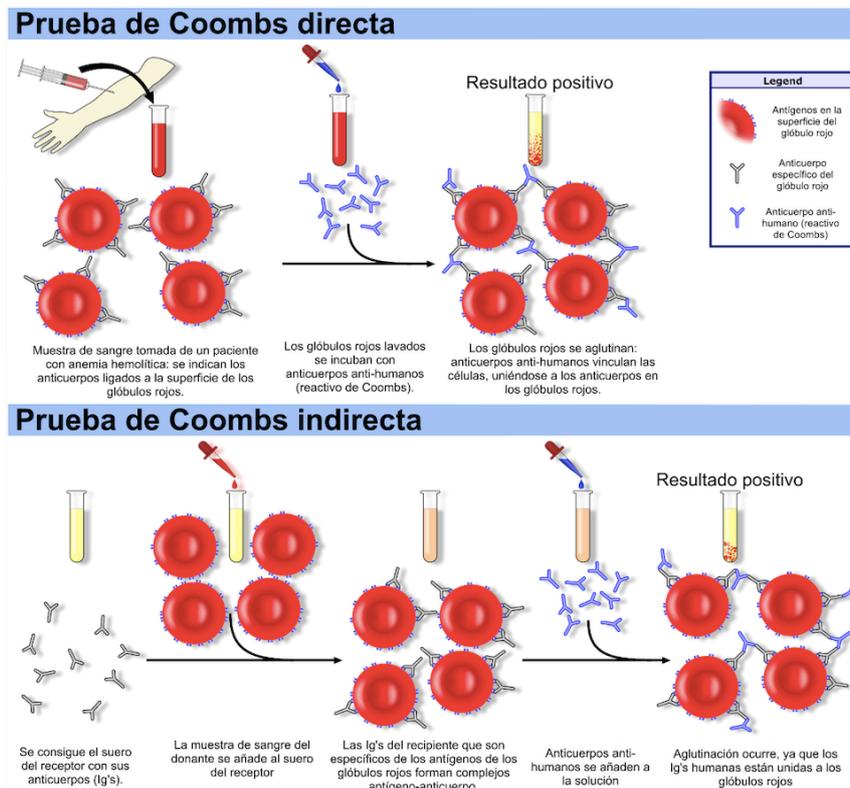
Se utiliza para demostrar el recubrimiento *in vivo* de eritrocitos con anticuerpos, principalmente IgG o con el complemento (C3). Los eritrocitos obtenidos de una venopunción, se lavan 3 veces con solución salina, a continuación, se realiza una suspensión en solución salina al 2-5% con los hematíes lavados. Se mezclan dos gotas de la suspensión y de los reactivos de antiglobulina humana (AGH), se centrifugan e incuban. Los anticuerpos del reactivo se unen a IgG o al C3 si están en la superficie de los hematíes produciendo la aglutinación, indicativo de un resultado positivo.

La prueba de antiglobulina directa se utiliza en la investigación de enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido, anemia hemolítica autoinmune, hemólisis inducida por drogas y en el estudio

de las reacciones alóinmunes contra eritrocitos transfundidos recientemente (García, 2009) (Figura 5).

## B.2) Prueba de antiglobulina indirecta

En este caso, tras incubar con eritrocitos el plasma (parte de la sangre que contiene el suero y los factores de coagulación) o suero (parte de la sangre sin factores de coagulación y donde se encuentran una gran concentración de anticuerpos) se realiza un lavado para eliminar las globulinas no unidas. La aglutinación, que ocurre cuando se agrega AGH, indica que el anticuerpo se ha unido a un antígeno específico presente sobre el eritrocito. Esta prueba se utiliza en la determinación del fenotipo de hematíes, en pruebas de compatibilidad cruzada, en donde el suero y los antígenos eritrocitarios son desconocidos, en el screening de suero de donantes y pacientes para anticuerpos, etc (Weisbach et al., 2006) (Figura 5).



**Figura 5. Prueba de antiglobulina o Coombs. El Coombs directo se usa para determinar si hay anticuerpos (IgG) o complemento (C3) unidos a la membrana de los eritrocitos. Los eritrocitos del paciente son incubados con anticuerpos anti-IgG y anti-C3. Si hay presencia de IgG o C3 en la membrana de los eritrocitos, se presenta aglutinación y la prueba es positiva. El Coombs indirecto se usa para detectar si hay anticuerpos IgG en el suero del paciente contra los eritrocitos. El suero del paciente se incuba con el reactivo con eritrocitos. Posteriormente se agrega el suero de Coombs (que contiene anticuerpos anti-IgG). Si hay autoanticuerpos o aloanticuerpos contra los eritrocitos, se presenta aglutinación y la prueba es positiva. Imagen tomada de [https://es.wikipedia.org/wiki/Prueba\\_de\\_Coombs](https://es.wikipedia.org/wiki/Prueba_de_Coombs).**

---

### **C. Técnica adsorción-elución**

Para casos serológicos complejos se utilizan técnicas más sensibles como las técnicas de adsorción-elución basadas en la modificación de los factores que determinan la reacción antígeno – anticuerpo y en la característica de reversibilidad de la misma. Estas técnicas juegan un rol importante para identificar anticuerpos en muestras con resultado positivo en la prueba de antiglobulina directa, para detectar antígenos expresados débilmente, para concentrar y purificar anticuerpos, para la separación anticuerpos en suero con presencia de múltiples anticuerpos, etc (Pajares-Zamudio, 2017).

En este caso, aunque un anticuerpo puede no causar aglutinación directa, puede adsorberse sobre hematíes antígeno - positivos. En este sentido, su posterior recuperación a partir de los hematíes recubiertos demuestran que se ha producido una interacción antígeno-anticuerpo (Peralta et al., 2015).

---

### **D. Prueba de adherencia de células rojas en fase sólida (Solid-phase red blood cell adherence assay - SPRCA)**

Los ensayos en fase sólida se han desarrollado como alternativas a las pruebas de rutina basadas en la hemaglutinación. En la determinación ABO y Rh en fase sólida se emplean placas cuyos pocillos han sido recubiertos previamente con el anticuerpo, a los que posteriormente se adicionan los hematíes. Si las células expresan el correspondiente antígeno, se adhieren a las paredes del pocillo, si no ocurre reacción antígeno-anticuerpo, las células se van al fondo del pocillo (prueba directa).

En el caso de pruebas indirectas se utilizan componentes de los eritrocitos, por ejemplo, proteínas específicas de membrana que son fijadas a los pocillos de la microplaca. Posteriormente, se adiciona el suero o plasma problema a los pocillos recubiertos con eritrocitos. Una fase de lavado elimina las inmunoglobulinas no unidas, se añaden células sensibilizadas con anti-IgG y se observa la reacción. Al igual que en la prueba directa, se observa reacción positiva cuando los eritrocitos se adhieren a las paredes del pocillo (Sandler *et al.*, 2000)

Esta técnica también se ha desarrollado para la detección de anticuerpos-antiplaquetarios. Las membranas de las plaquetas son fijadas a la superficie de los pocillos. A continuación, se procede igual que antes, añadiendo el plasma o suero problema y la reacción IgG ligada a los hematíes (Ouweland *et al.*, 2006).

---

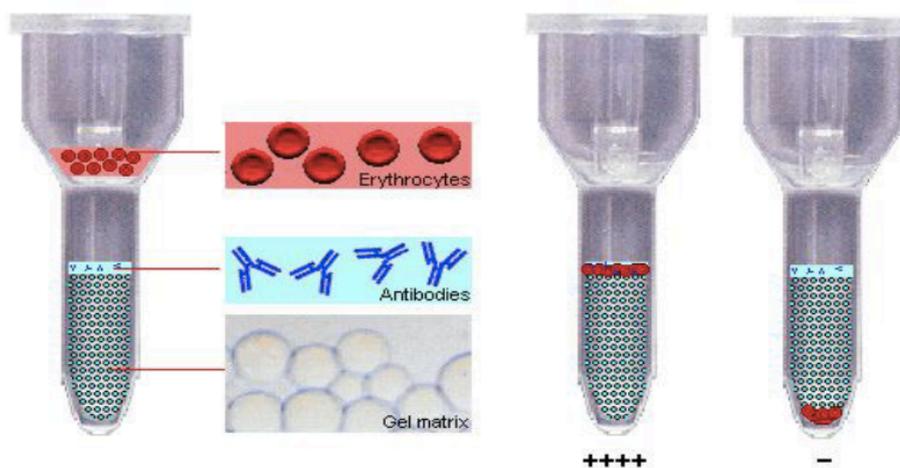
### **E. Aglutinación en microcolumnas de gel**

La aglutinación en microcolumnas de gel se fundamenta en la cromatografía por filtración. En este caso, los eritrocitos se hacen pasar a través de la columna mediante centrifugación. El medio

## Introducción

de la columna separa los eritrocitos aglutinados de los no aglutinados, de acuerdo al tamaño del agregado

Como muestra la **Figura 6**, en la parte superior de la columna se depositan las gotas de sangre, a continuación, se centrifuga la tarjeta (**Figura 7**), que contiene las microcolumnas, y los hematíes sensibilizados reaccionan con el antisuero específico. En un resultado positivo los aglutinados, formados por la reacción antígeno-anticuerpo, se observan a lo largo del gel o en la parte superior, mientras que un resultado negativo, los hematíes no sensibilizados van al fondo de la microcolumna (García, 2009).



**Figura 6.** Esquema que muestra la reacción de aglutinación en las microcolumnas de gel. En la parte superior se deposita las gotas de sangre, a continuación, los hematíes sensibilizados reaccionan con el antisuero específico durante la centrifugación. El resultado positivo se observa los aglutinados a lo largo del gel o en la parte superior, mientras que un resultado negativo los hematíes no sensibilizados van al fondo del microtubo. Imagen tomada de Miller A., Viano L. (2014). Microtécnica de aglutinación en gel. Fundamentos y técnicas básicas. Montevideo-Uruguay.

En la **Figura 7** es un ejemplo de una tarjeta que detecta los antígenos más relevantes del sistema Rh (D, C, c, E, e). La reacción de aglutinación se ha originado que aquellas muestras en las que estaba presente alguno de los antígenos. Los resultados positivos muestran aglutinados en la parte superior del microtubo (resultados C, D, e) a diferencia de los resultados negativos c, E.



Figura 7. Ejemplo de tarjeta con microcolumnas de gel. Con esta tarjeta se determinan los antígenos D, C, c E, e. Resultados positivos la aglutinación se forma en la parte de arriba del gel (ver resultado C, D, e) y los resultados negativos en el fondo de la columna (ver resultados c, E). La columna ctl es el control propio del test. Imagen tomada de Miller A., Viano L. (2014). Microtécnica de aglutinación en gel. Fundamentos y técnicas básicas. Montevideo-Uruguay.

### F. Inmunofluorescencia

Las pruebas de inmunofluorescencia permiten la identificación y localización de antígenos tanto dentro como en la superficie de las células. La base de este proceso es la siguiente: es posible unir un fluorocromo, como la fluoresceína o ficoeritrina, a una molécula de anticuerpo sin alterar su especificidad o su capacidad para unirse al antígeno. Así, la unión del anticuerpo marcado con fluoresceína al antígeno de la célula, hace que la célula cubierta con el anticuerpo unido aparezca de un color (verde, amarillo brillante o rojo) dependiente del fluorocromo. Los anticuerpos fluorescentes pueden ser usados en procedimientos directos o indirectos, siendo la fluorescencia análoga a la aglutinación como punto final. En las pruebas directas, el anticuerpo marcado con fluoresceína es específico para el antígeno de interés. En la prueba indirecta, se adiciona antiglobulina marcada con fluoresceína a las células que han sido incubadas con un anticuerpo no marcado de especificidad conocida (García, 2009).

Las técnicas de inmunofluorescencia también son usadas para las plaquetas, en cuyo caso se denomina 'Prueba de inmunofluorescencia para plaquetas' (PIFT). Esta técnica evidencia la presencia de los aloanticuerpos del suero problema fijados en la membrana de las plaquetas control mediante una antiglobulina humana fluorescente (Davoren, et al. 2004).

### G. Citometría de flujo

El fundamento de la citometría de flujo consiste en hacer pasar las células alineadas y de manera individual por delante de un láser y medir la luz emitida por cada una de las células a medida que

## Introducción

lo atraviesan. De esta forma, el sistema mide, por un lado, el grado de dispersión de luz (indicador del tamaño, forma y estructura de la partícula) y, por otro lado, si las partículas han sido teñidas con una o más moléculas fluorescentes, el láser excita estas moléculas proporcionando una información biológica adicional relacionada con cada partícula individual, como la actividad metabólica, el contenido en ADN o la presencia de determinados marcadores intracelulares o de superficie. De forma precisa el sistema óptico y electrónico recogen tanto la luz dispersada como la fluorescencia emitida por cada partícula para luego convertirla en una señal digital que puede ser interpretada por el ordenador para su análisis (Juan *et al.*, 2014). Así, el objetivo del análisis por inmunofluorescencia en citometría de flujo es asignar a cada célula a un grupo específico de células que compartan propiedades comunes. El primer paso es identificar las células de interés y distinguirlas de los otros tipos celulares; a continuación, se puede usar la inmunofluorescencia para determinar la proporción o el número de células que poseen un determinado marcador. Se puede conocer aspectos físicos de la célula (tamaño y complejidad) y determinar la presencia o ausencia de determinados antígenos (habitualmente entre 3 y 4) en los diferentes compartimentos celulares (superficie celular, citoplasma, mitocondria y núcleo) lo que contribuye a aumentar, tanto la especificidad como la sensibilidad de la prueba (Ramírez *et al.*, 2004).

Asimismo, los anticuerpos inmunofluorescentes se han usado en citometría de flujo para cuantificar la hemorragia feto-materna, para identificar las células transfundidas y medir su vida media en los receptores, para medir niveles bajos de IgG unida a las células, así como para distinguir la expresión homocigota de la heterocigota de los antígenos de los grupos sanguíneos.

---

### H. ELISA

Asimismo, en los bancos de sangre se usan también las pruebas de inmunoabsorción ligado a enzimas, conocidas como ELISA por sus siglas en inglés (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assays) para identificar antígenos o anticuerpos.

El ELISA es una técnica en la que el antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar una reacción cuyo producto, por ejemplo, un colorante, puede ser medido espectrofotométricamente (García, 2009). El anticuerpo conjugado a la enzima, que suele ser una fosfatasa alcalina o una peroxidasa, se emplea en los ensayos tipo sándwich, directos o indirectos, etc. Esta enzima no interfiere ni en la especificidad del anticuerpo ni en la actividad enzimática. Dicha unión anticuerpo-enzima o antígeno-enzima ha de producirse durante un determinado período de tiempo para que se produzca la solución coloreada que es cuantificada mediante un espectrofotómetro.

Esta prueba se ha usado para detectar y medir IgG unida a las células y así demostrar hemorragia feto-materna. Cuando se examinan eritrocitos, la prueba se denomina prueba de

antiglobulina ligada a enzima o ELAT (en inglés, Enzyme-Linked Antiglobulina Test). Esta técnica también se utiliza para identificar los anticuerpos plaquetarios.

### **I. MAIEA (Monoclonal antibody-specific immobilization of erythrocyte antigens) y MAIPA (Monoclonal Antibody Immobilization Platelet Antigens)**

MAIEA es un inmunoensayo diseñado principalmente para localizar antígenos de grupos sanguíneos de proteínas específicas de membrana de glóbulos rojos. El ensayo implica la incubación de glóbulos rojos con dos anticuerpos, uno humano y otro no humano, generalmente un anticuerpo monoclonal de roedor, pero también es posible utilizar anticuerpos policlonales de origen de conejo, que reacciona con una porción diferente de la misma membrana proteica. Se obtiene un resultado negativo cuando los anticuerpos usados se unen a diferentes componentes de la membrana, por lo que no se forma complejo trimolecular. También se obtiene un resultado negativo cuando el anticuerpo monoclonal y el anticuerpo humano compiten por el mismo epítipo. Para un resultado positivo, ambos anticuerpos deben unirse a la misma proteína de membrana (Petty *et al.*, 1997).

En el caso de las plaquetas la técnica se denomina MAIPA. Es una técnica muy sensible ya que se puede definir simultáneamente la especificidad del anticuerpo detectado y la glicoproteína en la cual se localiza el antígeno, así como, determinar si las inmunoglobulinas están dirigidas contra antígenos HLA u otros específicos de plaquetas (Li *et al.*, 2018)

#### **4.1.1 Limitaciones de los métodos serológicos**

A pesar de que las técnicas serológicas son sencillas, robustas y eficaces, presentan, como cualquier otra técnica, algunas desventajas, que describimos a continuación. Limitaciones que se pueden solventar mediante el uso de técnicas moleculares como con el uso del test desarrollado en este proyecto.

Así, por un lado, los reactivos y métodos utilizados están diseñados para detectar la mayor cantidad de anticuerpos clínicamente significativos, pero no para los que no lo son. Es decir, la posible presencia de anticuerpos dirigidos contra los antígenos de baja frecuencia, que pueden no estar presentes en las células que conforman el panel.

Por otro lado, la sensibilidad de los anticuerpos, es decir, cuando el título de anticuerpos se encuentre por debajo del límite inferior de sensibilidad de la prueba, aunque esté presente en el suero no podrá ser detectado (Bastos, 2012).

Y, además, existen varios factores que pueden influir en la sensibilidad del método, ya que diversas variables determinan la velocidad y el grado de adsorción de anticuerpos:

# Introducción

## Proporción suero-células:

Los resultados falsos negativos de las pruebas de detección pueden deberse a un desequilibrio en la relación suero-glóbulos. Si hay un exceso de anticuerpos en el sistema se puede producir un falso negativo por efecto de prozona (es decir, hay una concentración elevada de anticuerpos en relación con el antígeno disponible, lo que origina ausencia de aglutinación o se produce reacciones falsas negativas de aglutinación a concentraciones elevadas de anticuerpo como resultante de la mala formación de estructuras de enrejado molecular y por el bloqueo estérico por el exceso de anticuerpo) y si el antígeno se encuentra en exceso, el falso negativo puede ser debido al efecto postzona (es decir, el antígeno está en exceso y se saturan los sitios de unión del anticuerpo con antígeno, de manera que no se origina la reacción de aglutinación).

La cantidad de anticuerpos adsorbidos por el glóbulo rojo (GR) alcanza el máximo cuando la relación suero: GR es de aproximadamente 1000:1, aunque en condiciones normales la relación es mucho menor. Una relación de dos gotas de suero por una gota de suspensión globular normalmente asegura el equilibrio adecuado entre el antígeno y el anticuerpo para permitir la sensibilización de los glóbulos rojos y su posterior aglutinación. Esta proporción suero: GR varía entre 19:1 a 70:1.

En ocasiones, cuando un anticuerpo es débil, la cantidad de suero en el sistema de prueba se puede incrementar, lo cual proporciona más anticuerpos para reaccionar con los antígenos disponibles 130:1. Esto no debe hacerse cuando se utilizan medios potenciadores en la prueba (Bastos, 2012).

## Temperatura:

La temperatura óptima en la que un anticuerpo reacciona puede ser una herramienta para la detección e identificación. Las pruebas cruzadas de compatibilidad pretransfusionales buscan anticuerpos clínicamente significativos, que generalmente reaccionan a 37 °C (Bastos, 2012).

## Tiempo de incubación:

Las reacciones antígeno-anticuerpo se encuentran en un equilibrio dinámico que se alcanza en un tiempo determinado que depende de la concentración de antígeno y anticuerpo, del tipo de inmunoglobulina y de la configuración antigénica y del fragmento de unión a antígeno Fab por sus siglas en inglés) que es la región en un anticuerpo se une a los antígenos.

Si el tiempo de contacto es demasiado corto, no habrá suficiente cantidad de células sensibilizadas. Si, por el contrario, los tiempos de incubación se alargan demasiado, el anticuerpo unido puede comenzar a disociarse de la célula.

## Introducción

De acuerdo con el trabajo publicado por Hughes-Jones en 1962, la absorción máxima de anticuerpos se logra después de cuatro horas; el 40% de esta cantidad, después de 15 minutos; el 87%, después de una hora y el 99% después de dos horas.

El tiempo de incubación dependerá del medio en el cual se realiza la prueba. Si se hace en medio salino, es necesario incubar el sistema durante 30 a 60 minutos; en cambio, si se utilizan medios potenciadores, como por ejemplo LISS (solución de baja fuerza iónica), el tiempo de incubación será de tan solo 10 minutos (Bastos, 2012).

### pH:

La mayoría de los anticuerpos reaccionan mejor a un pH neutro entre 6,8 y 7,2. Sin embargo, algunos anticuerpos muestran una mejor reactividad a un pH de 6.5 lo que permite distinguir unos anticuerpos de otros (Bastos, 2012).

Otra limitación es la posible carencia de anticuerpos lo suficientemente específicos o sensibles para la detección de las diferentes variantes de los múltiples antígenos sanguíneos clínicamente significativos. En estos casos la serología da lugar a un falso negativo, ya que el antígeno, no detectado, sí está presente sin embargo en la superficie de los eritrocitos, lo cual podría generar una reacción inmunológica en un paciente al que se le ha transfundido con dicha sangre (Daniels, 2013b).

Finalmente, puede resultar también limitante la falta de precisión a la hora del tipaje sanguíneo en pacientes a los que recientemente se les ha transfundido sangre donde coexisten glóbulos rojos del paciente y del donante. O en pacientes con anemia hemolítica autoinmune, donde la presencia de inmunoglobulina G (IgG) unida invalida el fenotipo de los glóbulos rojos por la prueba indirecta de antiglobulina. Las técnicas de eliminación de IgG no siempre son efectivas y pueden destruir el antígeno de interés. (Jungbauer *et al.*, 2012; Casas *et al.*, 2015).

---

## 4.2 Métodos moleculares

El rápido progreso en el conocimiento de la base genética de los polimorfismos de los antígenos de plaquetarios y eritrocitarios junto con el desarrollo comercial de la tecnología basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha hecho posible la detección de los diversos antígenos de los grupos sanguíneos (Westhoff, 2006) mediante técnicas basadas en ADN. Estas técnicas moleculares se han usado convenientemente como pruebas suplementarias a las técnicas serológicas actuales (Reid, 2003).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), técnica descrita por primera vez en 1985 por Kary Mullis, consiste en alternar unos ciclos de altas y bajas temperaturas para obtener múltiples

## Introducción

copias de las regiones específicas de ADN, lo cual permite demostrar la presencia o ausencia de alelos de interés (genotipado) de manera sencilla.

La PCR básica consta, en el caso de que se utilice una polimerasa hot-start, como ha sido en nuestro proyecto, de un primer paso de calentamiento hasta 94-95°C durante 5-10 minutos en el que se activa la ADN polimerasa, necesaria para replicar las hebras de ADN. Posteriormente se realizan tres pasos: 1. Desnaturalización de las hebras de ADN, mediante calentamiento a ~95°C durante 30"-1'; 2. Unión del cebador o primer a la hebra de ADN mediante enfriamiento hasta la denominada T<sub>m</sub> o temperatura de anillamiento del primer, a la cual se mantiene la reacción durante unos 10-30"; y 3. Extensión de la cadena de síntesis, a unos 70-72°C durante un tiempo que depende de la longitud del fragmento a amplificar, a un ratio de 1kb/30"-1' que se repiten entre ~25-40 veces dependiendo de la cantidad de producto amplificado deseado (**Figura 8**).

Finalizado todos los ciclos se producen dos últimos pasos, uno de extensión de la cadena a la temperatura óptima de la ADN polimerasa, normalmente 72°C durante 5-10' y un enfriamiento final de la muestra para su correcta conservación (4-10°C) hasta la recogida de las reacciones.

## Introducción

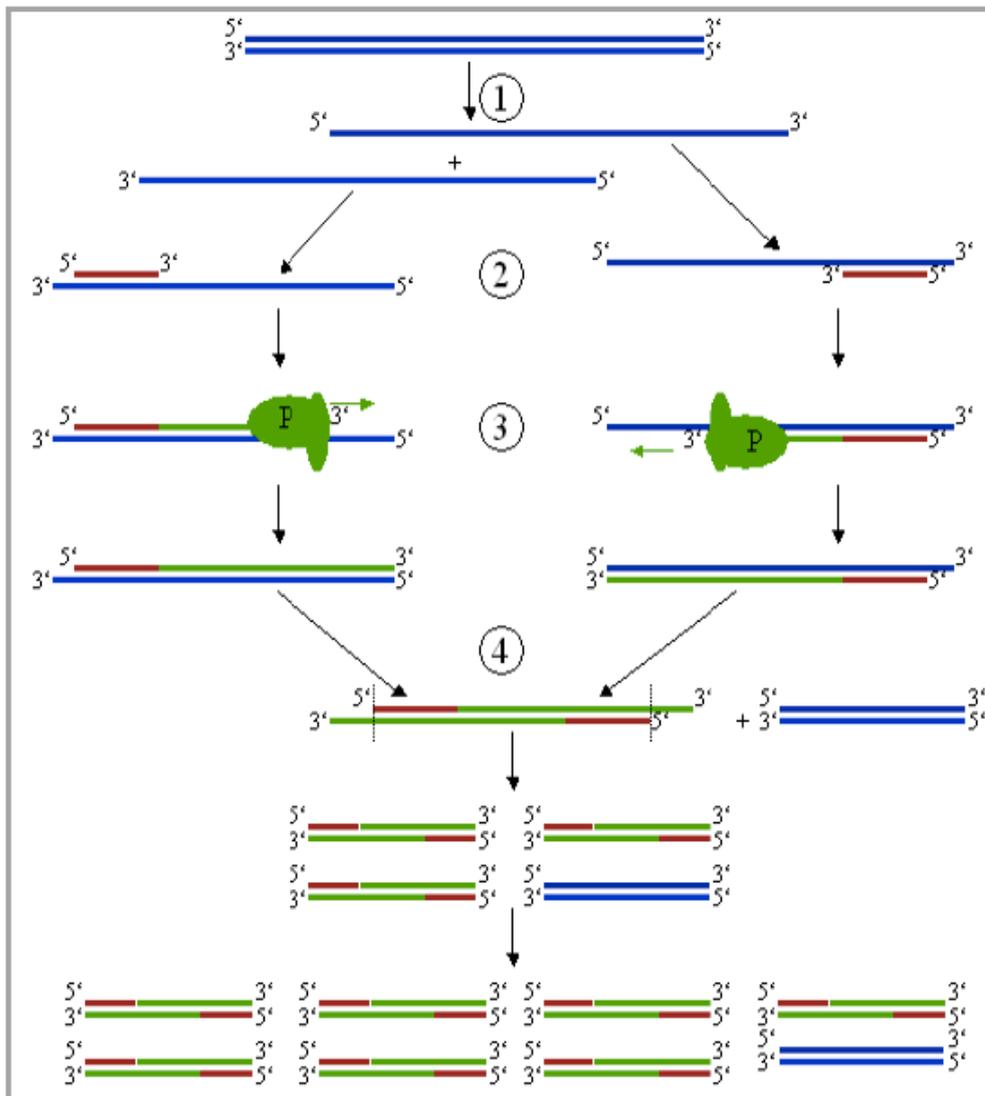


Figura 8. Dibujo esquemático en el que se muestran los pasos que se dan en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar un fragmento de ADN. Imagen tomada de [https://es.wikipedia.org/wiki/Reacci3n\\_en\\_cadena\\_de\\_la\\_polimerasa](https://es.wikipedia.org/wiki/Reacci3n_en_cadena_de_la_polimerasa).

Mediante secuenciación de ADN, se ha observado que la gran mayoría de los antígenos de los grupos sanguíneos genéticamente definidos son la consecuencia de un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) (Reid, 2003). Estos SNPs pueden estar presentes en la región codificadora del gen, es decir, la que se traduce directamente para dar origen a la proteína, o en la región reguladora que se encarga de su expresión (Pajares-Zamudio, 2017). Así, se han determinado las bases moleculares para todos los polimorfismos de los grupos sanguíneos clínicamente importantes, además de las variantes raras (Daniels, 2011).

El conocimiento conjunto del fundamento de la PCR y de los polimorfismos de los grupos sanguíneos ha conllevado a la descripción de una multitud de ensayos basados en la detección de SNPs específicos de los grupos sanguíneos. Estos ensayos incluyen PCR-RFLP (PCR

## Introducción

seguida de digestión de los productos mediante las enzimas de restricción específicas), PCR específica de alelo, PCR cuantitativa en tiempo real, tecnología de genotipado de alto rendimiento como microarrays (chips) (Westhoff, 2006) o como la tecnología Luminex® xMAP™ utilizada para desarrollar el test ID RHD XT desarrollado en este proyecto así como tecnologías de secuenciación de nueva generación (Next-Generation Sequencing-NGS) utilizadas por ejemplo mediante la plataforma MiSeq de Illumina (Giollo M., 2015; Tilley L, 2014).

Los métodos de genotipado de grupos sanguíneos basados en ADN están disponibles desde hace más de 10 años, están considerados como parte importante de la inmunogenética y son aplicables para el diagnóstico clínico en las áreas de hematopatología, servicio transfusional, genética, etc. Su implementación varía considerablemente entre los diferentes sistemas de salud, especialmente entre América del Norte y Europa (Flegel, 2007). A continuación, describiremos más en detalle dos de ellos, la tecnología Luminex XMAP (utilizada en este proyecto para desarrollar el test ID RHD XT) y la técnica basada en Next-Generation Sequencing (NGS) (mediante MiSeq de Illumina).

---

### A. Tecnología Luminex XMAP

La tecnología Luminex® xMAP™ (MAP Multi-Analyte Profiling) es una plataforma creada a finales de la década de 1990. El principio de la tecnología xMAP se basa en el concepto de una matriz líquida (en suspensión), en contraste con la tecnología convencional de microarrays donde la identidad del analito se caracteriza por su posición en el portaobjetos de vidrio (Reslova *et al.*, 2017).

Esta matriz en suspensión está formada por un conjunto de microesferas o beads teñidas internamente con dos fluoróforos espectralmente diferentes (i.e. rojo e infrarrojo). Las diferentes concentraciones de los colorantes internos permiten producir una matriz de 100 microesferas espectralmente distintas. La integración de un tercer tinte interno ha permitido la expansión de conjuntos de microesferas de hasta un número de 500 (Dunbar *et al.*, 2010).

La superficie de cada conjunto de microesferas permite un acoplamiento químico simple de varios reactivos específicos para un bioensayo particular, tales como ensayos de ácido nucleico, inmunoensayos, ensayos de enzimas o ensayos de receptor-ligando. En este sentido, un indicador fluorescente adicional (por ejemplo, estreptavidina-ficoeritrina (SAPE), Alexa 532, Cy3) acoplado a una molécula objetivo, permitirá su detección después de una captura específica en la superficie de la microesfera. Existen diferentes tipos de microesferas disponibles comercialmente (**Tabla 4**), y su selección generalmente está determinada por el tipo de

## Introducción

instrumentación utilizada para la detección y el analito particular de interés (Dunbar *et al.*, 2012; Houser, 2012).

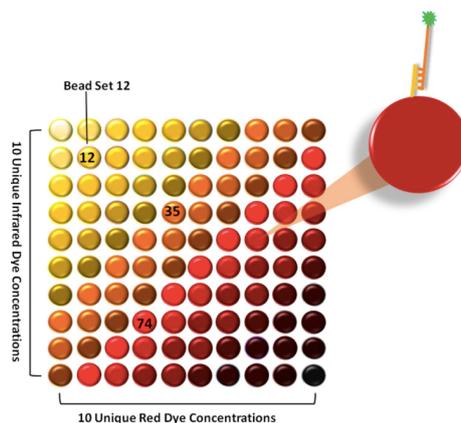
**Tabla 4. Tipos de microesferas comerciales.** La tabla muestra el tipo de microesfera, sus características (tamaño, estructura, número de microesferas disponibles en cada tipo) y el instrumento que es necesario para su detección, así como para que tipo de tipo de analito se usa (ácidos nucleicos o proteínas).

Tipo de microesfera	Tamaño (µm)	Estructura	Sets disponibles	Instrumento	Analito
MicroPlex®	5.6	No magneticas	100	Basado en citometía de flujo	Todos
MagPlex®	6.5	Magneticas	500	All xMAP	Todos
MagPlex-TAG™	6.5	Magneticas	150	All xMAP	Acidos nucleicos
LumAvidin	5.6	No magneticas	100	Basado en citometía de flujo	Proteinas
SeroMAP™	5.6	No magneticas	100	Basado en citometía de flujo	Proteinas

En nuestro caso, las microesferas son de poliestireno de 5.6 µm de diámetro y su superficie está cubierta por aproximadamente 108 grupos carboxilo (COOH) para el acoplamiento químico de reactivos específicos para un bioensayo particular, tales como ensayos de ácido nucleico, inmunoensayos, ensayos de enzimas o ensayos de receptor-ligando (Reslova *et al.*, 2017).

Así, la superficie de cada microesfera permite un acoplamiento químico de reactivos específicos para un bioensayo particular, tales como ensayos de ácido nucleico, inmunoensayos, ensayos de enzimas o ensayos de receptor-ligando

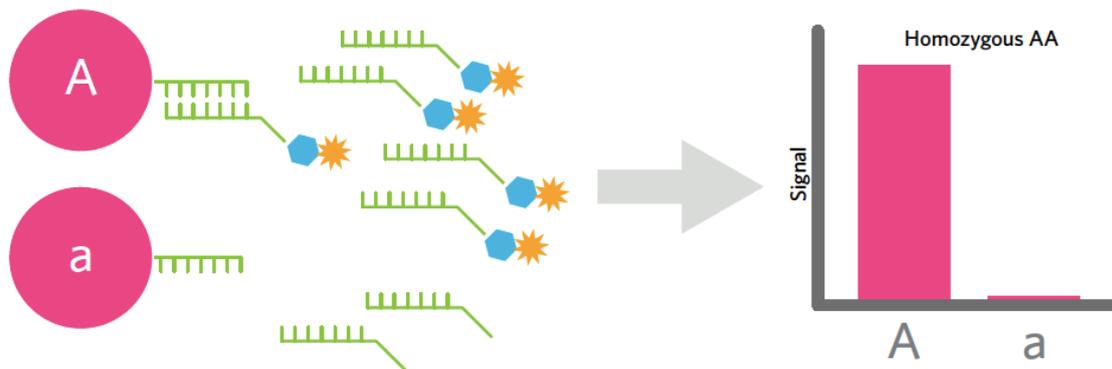
Las características espectrales únicas de cada bead dentro del conjunto que llamamos “bead region” permite que cada tipo de bead sea diferenciado específicamente de todos los demás en un ensayo multiplex (Angeloni *et al.*, 2018) (Figura 9).



**Figura 9.** La tecnología xMAP basada en microesferas teñidas internamente. Se usan diferentes concentraciones de fluoróforos rojos e infrarrojos para crear 100 conjuntos de microesferas distintas. Cada conjunto puede conjugarse con una molécula objetivo específica (líneas amarilla y naranja = ácido nucleico; punto verde = indicador fluorescente). Imagen tomada de Reslova N; Michna V; Kasny M; Mikel P; Kralik P. (2017). *xMAP Technology: Applications in Detection of Pathogens*. *Front Microbiol.* 8: 55.

## Introducción

En nuestro caso, los productos de PCR, previamente amplificados mediante PCR con dCTP-biotina, se hibridaron con sondas de oligonucleótidos complementarias previamente unidas a las microesferas (beads) de color, codificadas según la tecnología xMAP de Luminex (**Figura 10**).



**Figura 10.** Esquema del ensayo Luminex mediante PCR amplificada previamente con dCTP-biotina. Cada beads (A y a) tiene una secuencia de captura única (sonda) específica para la secuencia marcada (ADN amplificado con biotina). Si se une la secuencia marcada a la secuencia de captura única (sonda) se genera una señal de fluorescencia (Bead A) sino se se unen genera una mínima señal de fluorescencia llama background (Bead a). Imagen tomada de Angeloni S., Cordes R., Dunbar S., Garcia C., Gibson G., Martin C., Stone V. (2018). xMAP® Cookbook. A collection of methods and protocols for developing multiplex assays with xMAP Technology. Luminex. 4rd Edition.

Asimismo, se utiliza un marcador fluorescente adicional SAPE acoplado al dCTP-biotina, ya que la estreptavidina tiene una afinidad de unión extremadamente alta con la biotina, lo que permite su detección, después de una captura específica en la superficie de la microesfera.

El análisis de las microesferas se realiza por dos láseres. El láser / LED de clasificación roja (635 nm) excita los tintes fluorescentes internos de las microesferas, identificando así un conjunto de microesferas específico de acuerdo con su firma espectral. Si el analito de interés está presente, el láser / LED indicador verde (525–532 nm) reconoce el indicador fluorescente unido al analito capturado en la superficie de la microesfera (Reslova *et al.*, 2017) (**Figura 11**).

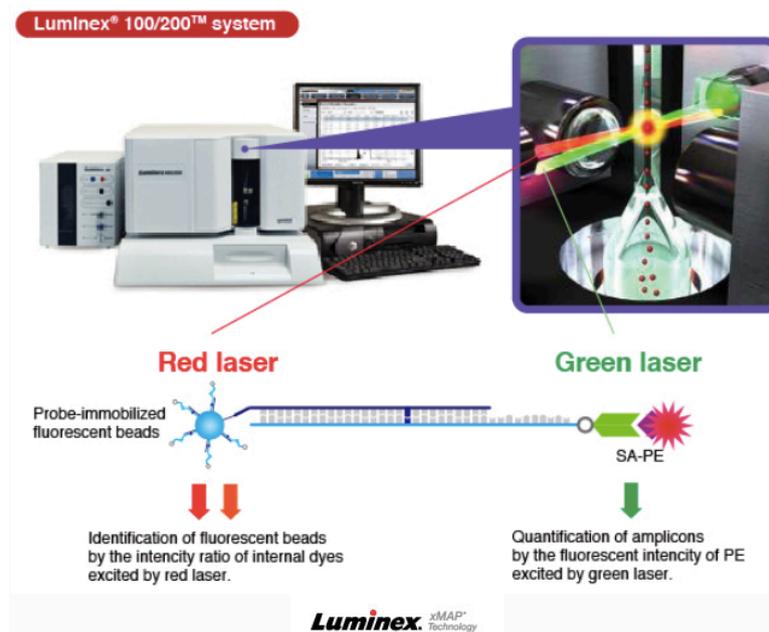


Figura 11. Diagrama que muestra el equipo Luminex formado por el láser rojo (635nm) que excita las microesferas y determinada cuál es cada una de los 100 tipos distintos existente y el láser verde (525-532 nm) que reconoce molécula fluorescente unida al analito capturado en la superficie de la microesfera. Imagen tomada de <https://www.luminexcorp.com>.

Los datos obtenidos con la tecnología son semicuantitativos ya que se realiza previamente una amplificación mediante PCR de los fragmentos de ADN de interés y, por tanto, no se conoce exactamente el número de moléculas presentes en la muestra original, sino que tan solo se puede hacer una estimación.

Las técnicas de detección multiplex de alto rendimiento como xMAP, están diseñadas para ser pruebas rápidas, sensibles y específicas de grandes cantidades de analitos (ensayos de ácido nucleico, inmunoensayos, ensayos de enzimas o ligandos de receptores) en una sola muestra biológica lo que permite el análisis en poco tiempo de un gran número de muestras.

Por otro lado, también existen métodos clásicos de detección de reacción única basados en la determinación de ácidos nucleicos como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) o la PCR transcripción inversa (RT-PCR) y los basados en anticuerpos como los ELISA que son considerados el “gold estándar” en muchos laboratorios. A pesar de la implementación de estos métodos para el diagnóstico molecular de rutina, su capacidad para detectar simultáneamente múltiples analitos en una sola reacción es limitada y esta limitación aún no se ha superado (Reslova *et al.*, 2017).

La creciente cantidad de datos de secuencia proteómica, transcriptómica y genómica de un gran número de organismos accesibles en bases de datos representa una oportunidad excepcional para el desarrollo de nuevas tecnologías de detección multiplex.

## Introducción

En este contexto, la tecnología xMAP representa una plataforma que puede beneficiarse de todos los avances en la investigación de ADN (Angeloni *et al.*, 2018).

Aunque la PCR permite la amplificación múltiple de varios objetivos en una sola ejecución, xMAP como metodología representa un avance significativo, y fue diseñado con el objetivo de crear una plataforma de bioensayo de alto rendimiento, que permita un análisis rápido, rentable y simultáneo de múltiples analitos dentro de una sola muestra biológica.

Así, como plataforma de arquitectura abierta, el sistema xMAP ofrece muchos beneficios para el usuario final lo que permite su implementación en laboratorios farmacéuticos, clínicos y de investigación (Dunbar *et al.*, 2010).

---

### **B. Next-Generation Sequencing (NGS). MiSeq de Illumina**

Las plataformas de genotipado de ADN interrogan solo un número limitado de SNPs. Actualmente no es posible un análisis de todos los grupos sanguíneos de interés en un solo ensayo (es decir, hay 360 antígenos eritrocíticos definidos y 33 antígenos plaquetarios codificados por cambios genéticos en 45 genes eritrocitarios y 6 plaquetarios). Se han identificado más de 2,000 alelos asociados con diferencias en el fenotipo de glóbulos rojos o con la producción de anticuerpos.

Una forma posible de determinar todos los antígenos eritrocitarios y plaquetarios de interés es a partir del uso de la secuenciación de alto rendimiento en las que se engloban las técnicas de secuenciación masiva o NGS (por sus siglas en inglés: Next Generation Sequencing) (Westhoff, 2019). Una de estas plataformas NGS conveniente es la plataforma MiSeq de Illumina, la cual está basada en la secuenciación por síntesis (Sequencing By Synthesis, SBS), la cual utiliza la amplificación clonal *in vitro* por medio de un PCR en puente (los fragmentos se amplifican a partir de unos cebadores unidos a una superficie sólida). En este caso, la biblioteca de secuenciación se prepara por fragmentación aleatoria de la muestra de ADN, y adición de adaptadores en los extremos 5' y 3', para permitir que sus cadenas desnaturalizadas puedan unirse a una superficie sólida denominada flow cell (**Figura 12**).

Cada fragmento se amplifica por medio de una amplificación en puente generando clusters de cadenas del mismo fragmento, con el fin de amplificar la señal generada por los nucleótidos fluorescentes incorporados a la cadena, en síntesis. Una vez realizada la amplificación, se procede a la secuenciación por síntesis, como es llamada la metodología de secuenciación de la plataforma Illumina. Esta metodología utiliza nucleótidos modificados con un fluoróforo reversible en el extremo 3'-OH que hace que estén químicamente bloqueados, impidiendo que otro nucleótido se añada a la nueva cadena hasta que ese fluoróforo no sea eliminado (Mardis, 2008). Así, al final de cada ciclo, se capta una imagen en la que se identifica el nucleótido añadido

## Introducción

y sus coordenadas en el flow cell, y se elimina el resto de fluoróforos y los bloqueantes se escinden lo que permite incorporar otra base y continuar la síntesis de la hebra de ADN y, por consiguiente, la secuenciación. Como cada base contiene un fluoróforo diferente, es posible "leer" la secuencia de ácido nucleico tras el análisis, mediante un software especializado, de la colección de imágenes obtenidas consecutivamente a medida que avanza la secuenciación (Mardis, 2008).

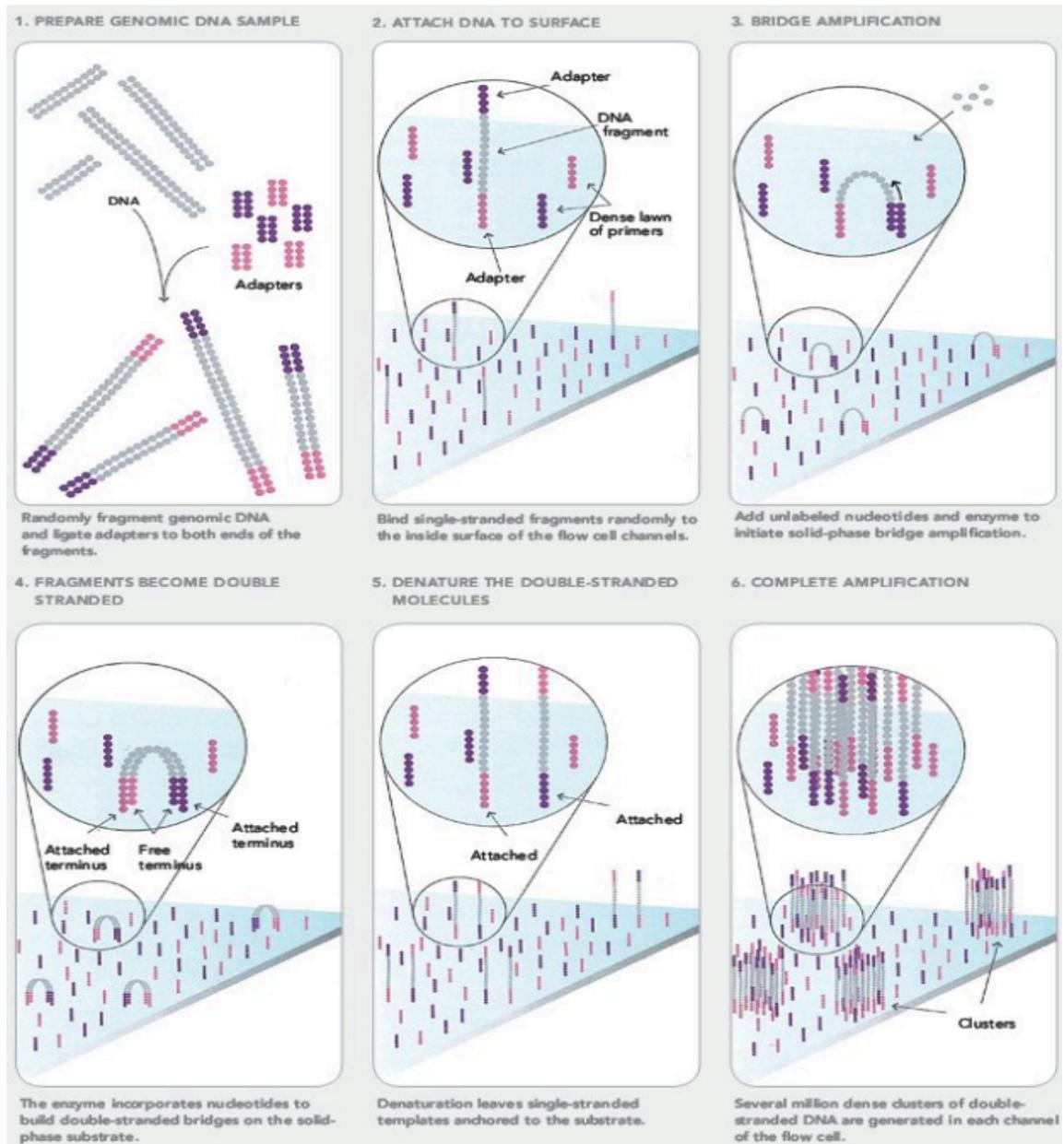


Figura 12. Secuenciación por síntesis Illumina. 1) Preparación de la librería 2) Amplificación del ADN y unión de los adaptadores a los extremos. 3) Generación de clústeres mediante PCR en puente. 4) Clústeres en cadena doble. 5) Desnaturalización cadena doble para eliminar las cadenas reversas. 6) Completada la amplificación con millones de clústeres en cada canal de la flow cell. Imagen tomada de [https://www.researchgate.net/figure/Illumina-sequencing-technology-overview-willuminacom\\_fig6\\_328743565](https://www.researchgate.net/figure/Illumina-sequencing-technology-overview-willuminacom_fig6_328743565)

Las principales desventajas en cuanto a utilizar la plataforma NGS en la rutina clínica son varias: su elevado coste, el tiempo en obtener un resultado que puede tardar hasta varios días, tiempo de espera inviable en la práctica clínica de un banco de sangre, así como el volumen de datos generados y el manejo de los mismos. Estas desventajas se pueden compensar con herramientas de genotipado alternativas como el test de genotipado desarrollado en este proyecto.

### 4.3 Aplicaciones de los métodos moleculares en medicina transfusional

Las pruebas de aglutinación han sido el estándar de oro para la identificación de antígenos de grupos sanguíneos durante más de 100 años, pero existen algunas limitaciones (Westhoff, 2006) superadas con el uso de los métodos moleculares. Así las aplicaciones actuales de estos métodos incluyen:

#### Pacientes politransfundidos

En pacientes que reciben transfusiones crónicas o masivas, la presencia de glóbulos rojos de los donantes en la sangre periférica a menudo hace que el fenotipo de los glóbulos rojos por técnicas de aglutinación sea inexacto (Reid *et al.*, 2000).

#### Cigosidad RhD

Las pruebas serológicas para la expresión de D, C/c, y E/e solo pueden predecir la probabilidad de que una muestra sea homocigótica (D / D) o heterocigótica (D /-) para RhD a diferencia del genotipado molecular que permite determinar la cigosidad mediante el análisis de la presencia de un alelo D-negativo recesivo. Como se ha comentado, varios eventos genéticos diferentes causan un fenotipo D-negativo (*RHD deletion*, *RHD\*ψ* y el gen híbrido D-negativo *RHD-CE-D*, estos dos últimos frecuentes en los grupos étnicos africanos subsaharianos (Singleton *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2002), por lo que, en la práctica prenatal, la prueba de cigosidad RhD paterna es importante para predecir el estado fetal D cuando la madre tiene anti-D.

#### Distinción entre “Weak D” y “Partial D”

Como hemos comentado anteriormente, los fenotipos Weak D presentan cambios de aminoácidos individuales que afectan la cantidad de proteína en la membrana, o que resulta en un número reducido de sitios de antígeno D en los glóbulos rojos. Los fenotipos Partial D presentan cambios de aminoácidos que alteran los epítomos D, o a menudo son proteínas híbridas con porciones de RhD unidas a porciones de RhCE (Flegel 2011; Daniels, 2013b).

En este sentido, la distinción entre fenotipos Weak D y Partial D es de importancia clínica, sobre todo de este último, ya que existe el riesgo de desarrollar aloinmunización anti-D. Los reactivos

## Introducción

de tipificación serológica de rutina no pueden distinguir entre estos tipos de glóbulos rojos, sin embargo, las estrategias de genotipado que muestran múltiples regiones de *RHD* sí pueden discriminar entre estos fenotipos (Westhoff, 2006).

### Confirmación de donantes RhD

Aproximadamente 0.1% de los eritrocitos de los donantes se asocia con una expresión RhD muy débil causante de aloinmunización y no detectada por los anticuerpos disponibles por lo que es esencial que los centros donantes realicen una prueba de expresión débil de RhD para evitar etiquetar incorrectamente una sangre como RhD-.

Y, por todo ello, este proyecto consiste en el desarrollo de una herramienta de genotipado, ID RHD XT diseñada en la tecnología X-MAP de Luminex® 200™, cuya tecnología base está consolidada desde años. Las principales ventajas en la elección de esta tecnología han sido: su alto rendimiento, su capacidad de análisis múltiple manera simultánea y, sobre todo, en el campo de la medicina transfusional, la rapidez de obtener los resultados en unas pocas horas, desde la recepción de la muestra problema hasta su solución. Además, este test va a formar parte de una familia de ensayos desarrollados previamente que identifican antígenos eritrocitarios y plaquetarios clínicamente más relevantes y, por lo tanto, con este nuevo ensayo se completa un portfolio existente y demandado por los usuarios. El test de diagnóstico desarrollado presenta una serie de aplicaciones clínicas que se pueden resumir en:

- La evaluación de un potencial de la aloinmunización anti-D en mujeres embarazadas para evitar la profilaxis con RhIG en mujeres embarazadas.
- Ahorro de unidades de sangre D en mujeres menores de 50 años y multitransfusión pacientes.
- La confirmación de las variantes D en pacientes y mujeres embarazadas.
- Confirmación de donantes D negativos en mezclas de muestras de donantes (screening de donantes) mediante screening de posibles variantes genéticas asociadas a presencia débil de antígeno D.

## Objetivos

La serología es una técnica empleada para la determinación de los grupos sanguíneos, cuyo fundamento se basa en la capacidad antigénica de los mismos. Sin embargo, no es siempre posible disponer de anticuerpos lo suficientemente específicos y/o sensibles para la detección de las diferentes variantes de los múltiples antígenos sanguíneos existentes. Por ello, en ocasiones la serología puede dar lugar a falsos negativos si no es capaz de detectar la presencia de antígenos. Un falso negativo puede dar lugar a una reacción inmunológica si una sangre de este tipo entra en contacto con la de un paciente que realmente si carece de tal antígeno. Este hecho es especialmente relevante en los denominados antígenos nulos o débiles (weak), en los que el antígeno que define el grupo sanguíneo o no se expresa, o no lo hace con suficiente nivel o bien carece de algunas regiones que son precisamente las que son reconocidas por los anticuerpos usados en la detección serológica. Un ejemplo son las variantes weak D, que determinan el fenotipo weak D que es el más común de todos los fenotipos asociados al sistema RH en la población de origen europeo, con una frecuencia de entre el 0.2 y el 1% de toda la población (Wagner *et al.*, 2009) cuya expresión del antígeno D es baja o muy baja, pudiendo causar su incorrecta clasificación como falsos D negativos. Por ello, el objetivo general de este trabajo ha sido desarrollar una herramienta de genotipado que permita caracterizar las variantes weak D tipo 1, 2 y 3 así como clasificar correctamente los fenotipos D negativos causados frecuentemente por las variantes: *RHD deletion*, *RHD\*ψ* y *RHD\*DIIIa-CE (3-7)-D*. Esta herramienta se denomina ID RHD XT, y ha sido implementada mediante la tecnología X-MAP de Luminex® 200™, la cual está basada en los principios de la citometría de flujo.

La consecución de dichos objetivos en pacientes permitirá:

- La confirmación de las variantes D en pacientes y mujeres embarazadas.
- En mujeres embarazadas en particular, la evaluación de una potencial aloinmunización anti-D y la consiguiente reducción de tratamiento profiláctico con RhIG (Rho (D) immune globulin).
- El ahorro de unidades de sangre D en mujeres y pacientes multitransfundidos.

La consecución de dichos objetivos en donantes permitirá:

- La aplicación del test para el screening de pool de muestras de donantes serológicamente D-C/E+, es decir, detectar posibles variantes genéticas asociadas a presencia débil del antígeno D. El análisis en pool de muestras permite el estudio de una gran cantidad de muestras a un coste razonable.
- La estimación del porcentaje de donantes D negativos C + y / o E + con presencia del gen *RHD*, así como el porcentaje de portadores de D negativos con variantes D que pueden conducir a la aloinmunización.

Todo ello redundará en la mejora de la calidad sanitaria de la población.

## Material y Métodos

### Fase 1: Diseño y optimización del test de genotipado sanguíneo (ID RHD XT)

Como ya hemos comentado, en este trabajo nos proponemos desarrollar un test de genotipado sanguíneo, ID RHD XT, que determina los polimorfismos de seis variantes del gen *RHD*, y simultáneamente, del sistema plaquetario las variantes HPA-1a y HPA-1b. Para ello en este capítulo se describen los “*Materiales y Métodos*” de las distintas fases por las que fue evolucionando el proyecto hasta lograr una herramienta cuyos resultados de genotipos y fenotipos predichos se reportan a partir de la combinación de las variantes alélicas analizadas.

#### 1.1 Descripción del test genético: variantes seleccionadas.

Las sangres con fenotipos RhD negativos son escasas, con una frecuencia observada en caucásicos del ~15%, en africanos sub-saharianos es del ~5-8% y en asiáticos no alcanza ni el 1% (Reid et al, 2004; Connie 2010), de ahí su enorme valor en la práctica clínica.

La delección del gen *RHD* se detecta por la ausencia de amplificación simultánea de los exones 1, 6 y 9 del gen. El fenotipo Weak D es el más común de los fenotipos poco frecuentes asociados al sistema Rh en la población caucásica europea, con una frecuencia de entre el 0,2 y el 1% (Haer-Wigman *et al.* 2013; Wagner *et al.* 2009). Y, en concreto, los tipos rs121912763: weak D tipo 1 (*RHD*: c. 809 T>G), rs711652374: weak D tipo 2 (*RHD*: c. 1154 G>C) y rs144969459: weak D tipo 3 (*RHD*: c. 8 C>G) son los más comunes entre los subtipos D débiles, constituyendo el 90-95% de estos casos en europeos (Flegel, 2011).

El antígeno plaquetario humano HPA-1 es uno de los polimorfismos más estudiados y presenta dos isoformas alélicas, a y b. Los anticuerpos HPA-1a son los aloanticuerpos plaquetarios más frecuentemente detectados en la práctica clínica, y son los causantes del 85% de los casos de trombocitopenia aloinmune del feto y del neonato (TAIFN) confirmados serológicamente (Curtis *et al.*, 2014).

En la **Tabla 5** se describen las variantes asociadas al gen *RHD* y al gen *ITGB3* (sistema plaquetario HPA-1) seleccionadas e incluidas en el test de genotipado sanguíneo ID RHD XT.

## Material y Métodos

Tabla 5. Variantes alélicas determinadas con el test ID RHD XT.

		Grupo sanguíneo				
	Fenotipo predicho	Alelos testados	Nombre ISBT	Cambio Aa	Cambio Nucleótido	Exon RhD
<b>RH</b>	Weak D Type 1	<i>RHD*weak D type 1</i>	<i>RHD*01W.1</i>	V270G	<i>RHD:c.809T&gt;G</i>	6
	Weak D Type 2	<i>RHD*weak D type 2</i>	<i>RHD*01W.2</i>	G385A	<i>RHD:c.1154G&gt;C</i>	9
	Weak D Type 3	<i>RHD*weak D type 3</i>	<i>RHD*01W.3</i>	S3C	<i>RHD:c.8C&gt;G</i>	1
	D-	<i>RHD*Pseudogene</i>	<i>RHD*08N.01</i>	Y269X	<i>RHD:c.807T&gt;G</i>	6
	D-	<i>RHD*DIIIa-CE(3-7)-D</i>	<i>RHD*03N.01</i>	Several	<i>RHD-CE-D hybrid</i>	3-7
	D-	<i>RHD deletion</i>	<i>RHD*01N.01</i>	No protein	<i>RHD exons 1, 6 and 9 absence</i>	1, 6, 9
<b>HPA-1</b>	HPA-1a, HPA-1b	<i>HPA1a, HPA1b</i>	N.A.	L33P	<i>ITGB3: c.176T&gt;C</i>	N.A.

### 1.2 Muestras biológicas para la construcción de la genoteca con las variantes alélicas de interés

Durante el desarrollo del test se utilizaron muestras recopiladas durante años por parte de "Progenika Biopharma, a Grifols Company", procedentes de los distintos colaboradores e usuarios de otros ensayos moleculares de diagnóstico de genotipado sanguíneo. Estos centros eran Hospital Vall d'Hebron (Barcelona), Centro Vasco de Transfusión y Tejidos Humanos de Euskadi (CVTTH), Hospital clínico universitario de Santiago de Compostela (Galicia), y Grifols Biomat - San Marcos Lab (Texas –USA).

#### A) ADNS GENÓMICOS

##### A.1) MUESTRAS DE ADN PROCEDENTES DE SANGRE TOTAL ANTICOAGULADA CON EDTA

De las muestras de sangre total se extrajo su ADN partiendo de 200 µl de sangre total y procesándolas con el ADN mini kit (QIAGEN) o con el QIAamp blood mini kit (QIAGEN). Al final del proceso, los ADN extraídos fueron eluidos en 100 µl del tampón AE del kit. Usamos indistintamente ambos kits ya que los dos presentan un principio de funcionamiento y eficiencia similares.

## Material y Métodos

En concreto, el protocolo de extracción utilizado fue el descrito en cada uno de estos kits de QIAGEN. Así, en primer lugar, se realiza la lisis de las células y para ello a los 200  $\mu$ L de sangre total se les añade 20  $\mu$ L de proteinasa K y 200  $\mu$ L buffer AL (buffer de lisis) del kit y se incuba a 56°C durante 10 minutos. Transcurrida la incubación se añade 200  $\mu$ L EtOH 100%, se mezcla y se transfiere el lisado a la columna de centrifugación del kit QIAamp Mini para proceder a realizar el paso que en la figura 10 se ha denominado "unión". A continuación, comienzan los pasos de lavado con dos buffers llamados AW1 y AW2, Tras añadir 500  $\mu$ L de estos buffers sobre las columnas, se centrifugan: primero se añade el buffer AW1 y se centrifuga a 8000 rpm durante 1 minuto (desecha el eluido) y, a continuación, se repite el proceso esa vez con el AW2 y centrifugando a 14000 rpm durante 3 minutos. Tras la última centrifugación, se realiza el paso llamado "elución", en el que se añade, en nuestro caso, 100ul del buffer AE (10 mM Tris-Cl + 0.5 mM EDTA; pH 9.0) y se centrifuga a 8000 rpm durante 1 minuto. El eluido contendrá nuestro ADN purificado (**Figura 11**).

## Material y Métodos

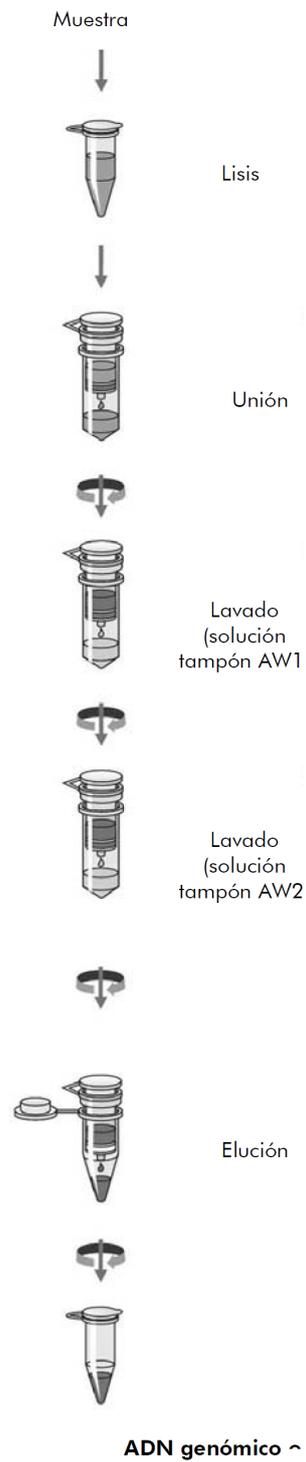


Figura 10. Dibujo esquemático con los pasos que se siguen para la extracción del ADN a partir de muestras de sangre total con el ADN mini kit (QIAGEN) o con el QIAamp blood mini kit (QIAGEN).

## Material y Métodos

### A.2) Líneas celulares

Procedentes tanto del *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC) como del *Coriell Institute for Medical Research*, en concreto de la colección NIGMS, *Human Genetic Cell Repository*. Todas estas muestras (ADN de sangres más ADN de líneas celulares) conformaron una genoteca de ADN (**Tabla 6**).

Esta genoteca contiene las variantes génicas que el test ID RHD XT será capaz de determinar, tanto del grupo sanguíneo RHD como del sistema HPA 1. En la tabla 6 se muestra la referencia a la codificación (columna ID) de cada una de las muestras que conformaron la genoteca. Este código fue el enviado por cada uno de los centros donantes de sangre o líneas celulares, y se mantuvo para facilitar su trazabilidad.

**Tabla 6.** Listado de muestras con sus genotipos para el grupo sanguíneo RhD como para el sistema HPA 1.

ID	Genotipo	
	RHD	HPA
BGG-14-0220	<i>RHD*weak D type 1 heterozygous, RHD*pseudogene heterozygous</i>	<i>HPA1a/1a</i>
BGG-11-0447	<i>RHD*weak D type 1</i>	<i>HPA1b/1b</i>
Mad 1055031	<i>RHD*weak D type 2</i>	<i>HPA1b/1b</i>
Galicia 16	<i>RHD*weak D type 2 heterozygous</i>	<i>HPA1a/1b</i>
Galicia 9	<i>RHD*weak D type 3 heterozygous</i>	<i>HPA1a/1b</i>
RBC12	<i>RHD*pseudogene</i>	<i>HPA1a/1b</i>
NA17344	<i>RHD*DIlla-CE(3-7)-D heterozygous</i>	<i>HPA1a/1a</i>
NA14706	<i>RHD deletion</i>	<i>HPA1a/1a</i>
Innotrain12460	<i>RHD*weak D type 3</i>	<i>HPA1a/1a</i>

### A.3) Whole genome amplification

Como la cantidad de las muestras de ADN genómico, a diferencia de las líneas celulares, era limitada, se sometieron a una amplificación completa del genoma con el fin de disponer de cantidad suficiente durante toda la fase de desarrollo. Hay que tener en cuenta que estas muestras son controles valiosos al ser variantes de baja frecuencia en la población. Para ello se empleó la tecnología denominada Whole Genome Amplification (WGA) empleando el kit *Illustra™ Ready-To-Go™ GenomiPhi™ V3 DNA Amplification Kit* (GE Healthcare). Este kit permite obtener cantidades superiores a 40 µg de DNA genómico a partir de muestras de 10 ng de ADN, y permite obtener una longitud de los productos superior a 10 kb. Todo el proceso se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System 9700. El protocolo es el siguiente; en

## Material y Métodos

primer lugar el ADN se desnatura mediante calor (95° - 3min) y después se enfría rápidamente, en hielo durante 2 minutos para mantener la doble hebra de ADN abierta. Se continúa trabajando en el hielo y se añaden 20 µL de la muestra desnaturada a las placas ya listas para usar "Ready to go Genomiphi" que contienen los reactivos liofilizados necesarios para que lleve a cabo la amplificación del ADN. Esta placa se incuba a 30°C durante 90 minutos (tiempo suficiente para alcanzar el máximo rendimiento de amplificación) y a continuación se realiza la inactivación de la enzima a 65°C durante 10 minutos. Tras la amplificación de las muestras se procedió a su cuantificación mediante un fluorímetro del tipo Qubit® Fluorometer mediante el Qubit® *dsDNA BR Assay Kit* (ThermoFisher scientific). La concentración de uso de toda la genoteca fue de 20 ng/µL.

Por último, estas muestras amplificadas se validaron (como controles de las variantes de interés) mediante el método de secuenciación Sanger y así confirmar que el proceso de amplificación mediante Genomiphi no había comprometido la fiabilidad del genotipo. El método Sanger está basado en el uso de dideoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs) como terminadores de cadena. Este método emplea como molde, ADN de cadena sencilla, un oligonucleótido de ADN (primer), una enzima polimerasa, nucleótidos marcados mediante fluorescencia y modificados (nucleótidos dideoxi) que terminan la extensión de la cadena de ADN. De esta forma se producen varios fragmentos de ADN de longitud variable, de forma que se obtienen fragmentos que abarcan todo el espectro de tamaños que componen la secuencia del fragmento de ADN en estudio. Para ello se amplificaron las zonas de interés mediante el uso del reactivo Kapa HotStart Ready Mix (5.5 µL por fragmento a amplificar) junto con 3.3 µL de cada primer mix de cada fragmento y 2 µL del ADN que queremos amplificar (en nuestro caso, las muestras de genomiphi). Obtenido el ADN amplificado se purificó mediante el ExoSAP-IT (ThermoFisher scientific). Este reactivo permitió realizar una purificación enzimática del producto de PCR amplificado mediante una hidrólisis de los primers y de los nucleótidos en exceso. El protocolo consistió en dos incubaciones, la primera a 37°C durante 30 minutos, donde las enzimas del reactivo digieren los primers en exceso y se desfosforilaron los nucleótidos y la segunda a 80°C durante 15 minutos para inactivar dichas enzimas. Finalmente, la reacción de secuenciación purificada se analiza en el secuenciador ABI PRISM 3130xl capillary Genetic Analyzer de 16 capilares y el análisis de las secuencias obtenidas se realizó mediante el programa SeqScape v3.0 de Applied Biosystems.

### A.4) ADN sintético

---

Por otro lado, para utilizar como control positivo para la detección de los polimorfismos analizados una vez diseñado el test, se diseñaron unos plásmidos de ADN sintético recombinante con todas las variantes que interroga el test. El objetivo principal de usar ID RHD CONTROL es detectar un posible fallo en cualquiera de los pasos del proceso (amplificación de

## Material y Métodos

ADN, hibridación y / o proceso de marcaje) mediante la monitorización de las 2 sondas que caracterizan cada polimorfismo examinado con el test.

Los plásmidos pueden utilizarse como vectores de clonaje y amplificación de fragmentos de ADN que se hayan insertado en los mismos mediante técnicas de Ingeniería Genética. Estos fragmentos se replican y se transmiten a las células hijas conjuntamente con el resto del plásmido. (Thomas *et al*; 2008 y Kandavelou *et al*; 2008). Estos plásmidos fueron sintetizados por IDT (*Integrated DNA Technologies*) a quien se les facilitó las secuencias genómicas que contienen las variantes alélicas del gen *RHD* (*RHD\*weak D type 1*, *RHD\*weak D type 2*, *RHD\*weak D type 3*, *RHD deletion*, *RHD\*Pseudogene and RHD\*DIIIa-CE(3-7)-D*) y el gen *ITGB3* del sistema HPA-1. Se sintetizaron dos plásmidos; ID RHD CONTROL 1 y ID RHD CONTROL 2 ambos los cuales presentaban respectivamente las variantes alélicas 1 (variantes alélicas de baja frecuencia) y 2 (variantes alélicas frecuentes) respectivamente analizadas con el test (ver Tabla 7). ID RHD CONTROL 1 y 2 son insertos de 1761 pb en un plásmido cuyo tamaño es de 4513 pb, llamado por IDT como pUCIDT (Amp), tiene un gen que actúa como marcador de selección y es de resistencia al antibiótico ampicilina.

Estos dos controles se utilizaron como controles positivos de procesamiento, es decir, los controles invalidarían el resto de resultados obtenidos si sus genotipos de polimorfismo no eran los esperados.

**Tabla 7. Resultado de los genotipos de controles sintéticos (ID RHD CONTROL 1 y ID RHD CONTROL 2) de los polimorfismos analizados.**

Polimorfismo	NOMBRE DE LOS CONTROLES (ID)	
	ID RHD CONTROL 1	ID RHD CONTROL 2
<i>RHD: c.8C&gt;G</i>	<i>RHD: c.8GG</i>	<i>RHD: c.8CC</i>
<i>RHD: c.807T&gt;G</i>	<i>RHD: c.807GG</i>	<i>RHD: c.807TT</i>
<i>RHD: c.809T&gt;G</i>	<i>RHD: c.809GG</i>	<i>RHD: c.809TT</i>
<i>RHD: c.1154G&gt;C</i>	<i>RHD: c.1154CC</i>	<i>RHD: c.1154GG</i>
<i>ITGB3: c.176T&gt;C</i>	<i>ITGB3: c.176CC</i>	<i>ITGB3: c.176TT</i>
<i>RHD-CE-D hybrid</i>	<i>RHD-CE-D hybrid</i>	<i>RHD-CE-D no hybrid</i>

### 1.3 Test de genotipado ID RHD XT.

La detección genética de las variantes del gen *RHD* se realizó con el test de genotipado ID RHD XT. El procesamiento consiste en los siguientes pasos (ver Figura 11):

#### 1.3.1 Amplificación mediante PCR multiplex.

#### 1.3.2 Hibridación y Marcaje.

## Material y Métodos

1.3.3 Detección de la señal con la tecnología Luminex® 200™.

1.3.4 Análisis de los resultados mediante software desarrollado para el test ID RHD XT.



Figura 11. Procedimiento a seguir con el test de de genotipado ID RHD XT.

1.3.1 Amplificación mediante PCR multiplex.

A. Diseño de primers (cebadores) específicos.

Se diseñaron *primers* específicos y comunes, tanto para las muestras genómicas como para los plásmidos sintéticos, para amplificar las regiones donde se localizan las variantes descritas en el punto 1.1. Hay que tener en cuenta que dicha amplificación se realiza mediante *PCR* multiplex con marcaje de biotina. El marcaje con biotina se realiza con el fin de marcar los productos de amplificación para su posterior revelado con estreptavidina-ficoeritrina (SAPE). Para ello, se incluyó la biotin-dCTP en la mezcla de *PCR*. La relación óptima biotin-dCTP vs dCTP libre se estableció durante la optimización de la mezcla de *PCR*.

Para optimizar la reacción de *PCR* multiplex se siguieron las recomendaciones elaboradas por Henegariu *et al.* (1997), teniendo en cuenta que diseñar una *PCR* multiplex con varios fragmentos supone un riesgo a la hora de detectar la presencia de cada SNP de forma concluyente si no fuera posible obtener una señal suficiente. Para superar esta dificultad se añadieron, en aquellos primers en los que se vio que era necesario por la baja eficiencia en la

## Material y Métodos

amplificación, dos pequeños fragmentos llamados TAGs, de 18 pares de bases, en el extremo 5' de cada uno de los *primers forward* y *reverse*. De esta manera la temperatura de anillamiento de los *primers* se hizo más uniforme tras los primeros ciclos y así se facilitó que todos los exones se amplificasen con una eficiencia similar en la reacción de PCR multiplex.

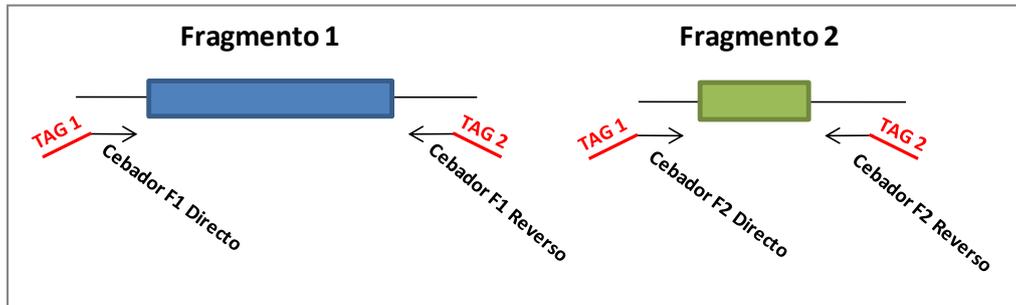


Figura 12. Dibujo esquemático de dos fragmentos, llamados Tags, añadidos en el extremo 5' en cada uno de los cebadores forward y reverse de dos fragmentos de PCR.

La optimización de una única reacción de PCR multiplex con los exones 1, 6 y 9 y el intrón 3 del gen *RHD* deja la puerta abierta, si fuera necesario, a la inclusión de nuevas variantes localizadas en estos exones en futuras versiones del test.

Los genes *RHD* y *RHCE* presentan una similitud en su secuencia del 93,8% (Okuda *et al.* 2000). Por lo tanto, es deseable que los *primers* para amplificar los exones 1, 6 y 9, así como el intrón 3, del gen *RHD* fueran diseñados con secuencias específicas que permitieran la discriminación de los dos genes homólogos, *RHD* y *RHCE*. Así, los primers se diseñaron complementarios a las secuencias intrónicas (específicas del gen *RHD*) flanqueantes de cada exón concreto a amplificar, para así evitar la amplificación del gen *RHCE* altamente homólogo.

Ambos genes (*RHD* y *RHCE*) están asimismo orientados en direcciones opuestas y su alta identidad de secuencia los hace muy susceptibles a sufrir recombinaciones, conversiones génicas y otras alteraciones genéticas (Henegariu *et al.* 1997) por lo que fue necesario diseñar una batería de *primers* hasta que finalmente se consiguió un equilibrio entre señal de amplificación y especificidad. El tamaño de los amplicones debe ser pequeño (100 a 300 pb) para minimizar la posibilidad de que el impedimento estérico, es decir, el efecto producido cuando el volumen ocupado por un grupo funcional o átomo en una molécula impide que otra parte de la misma reaccione, afecte la eficiencia de la hibridación (Dunbar, 2006). Es una limitación intrínseca a la propia tecnología xMAP® de Luminex®.

Las secuencias de los *primers* se verificaron con la herramienta "primer blast" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para comprobar la especificidad de las regiones de interés. La efectividad del diseño de los primers se analizó mediante un análisis de fragmentos en un secuenciador *ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) verificando los

## Material y Métodos

tamaños de los amplicones y la cantidad de fragmentos de ADN amplificados. Al tratarse de muchos fragmentos con tamaños similares, un gel de agarosa no es lo suficientemente resolutivo para diferenciarlos y, por eso, se utilizó la electroforesis capilar que es capaz de diferenciar tamaños de 2 bases entre fragmentos de ADN.

El análisis de fragmentos consiste en realizar una electroforesis a nivel capilar y una detección de los fragmentos inducida por láser. Se utilizó como marcador de peso molecular el marcador GeneScan 500 LIZ, y un solo fluoróforo para marcar todos los productos de la PCR (- FAM) que se unió al extremo 5' de cada primer forward y reverse por lo que en la reacción de PCR se marcaron todos los productos. Posteriormente los distintos fragmentos se detectaron mediante el software de análisis Peak Scanner Software v 1.0. (Thermo Fisher Scientific).

Dado que el gen *RHD* puede estar deletado en la población caucásica y, de hecho, es una de las variantes que interroga el test, se incluyeron dos controles internos de amplificación, HGH (hormona de crecimiento) y HPA-1 (*Human Platelet Antigen*), para poder detectar falsos negativos (i.e., negativos que surgen no por delección del gen *RHD* sino porque la reacción de PCR ha sido defectuosa por error de procesamiento o falta de material genético (ADN)). HGH es la proteína codificada por el gen *GH1* cuya secuencia está altamente conservada en el genoma humano (Ballerini *et al.* 2008), por ello se eligió como control. Por otro lado, HPA-1 (localizado en exón 3 de gen *ITGB3*), se eligió con un doble objetivo: por un lado, es una región donde no existen delecciones, y por eso se utilizó como control interno de amplificación, y por otro aporta información adicional útil para el manejo de las mujeres embarazadas HPA-1 negativas. Esta información adicional está relacionada con la llamada trombocitopenia fetal o neonatal aloinmune (TFNA) siendo la causa más frecuente de trombocitopenia grave en el recién nacido. La TFNA es un proceso agudo donde las plaquetas fetales son destruidas durante la gestación por un anticuerpo circulante de tipo IgG presente en la madre, que atraviesa la barrera placentaria y va dirigido contra un antígeno específico plaquetar (HPA) heredado del padre. La TFNA se considera el proceso equivalente a la enfermedad hemolítica del recién nacido por incompatibilidad Rh, sin embargo, la diferencia con ésta, es que la TFNA puede aparecer durante la primera gestación hasta en un 30-50% de los casos. En la población caucásica, tiene especificidad frente al antígeno específico plaquetar HPA-1a en más del 80% de los casos (Rodríguez Wilhelmi *et al.* 2008)

Así, a la hora de diseñar estos controles se evaluó el efecto de dicho control interno sobre la amplificación del gen *RHD*, observándose que no afectaba a la sensibilidad en la detección de las variantes.

Así, el análisis de fragmentos con los primers de los exones 1, 6, 9 y el intrón 3 del gen *RHD* y HGH se realizó tanto mediante PCR uniplex (cada uno de los fragmentos se analizó

## Material y Métodos

individualmente) como mediante PCR multiplex (todos los fragmentos juntos). Por un lado, se verificó el tamaño esperado de los amplicones y por otro, se comprobó la eficiencia de la amplificación en la PCR multiplex analizando el tamaño de los picos obtenidos mediante el software de análisis. Finalmente, los primers definidos y que formaron parte de la PCR Master MIX (PCRMM) fueron sintetizados por IDT (Integrated DNA Technologies), purificados por HPLC (High Performance Liquid Chromatography) y resuspendidos en agua, a una concentración stock de 100  $\mu$ M.

Con esta técnica se comprobó que la intensidad de los amplificados fuese suficiente para su posterior hibridación con el sistema Luminex.

### B. Selección y optimización de la composición del buffer de PCR y de la concentración de Biotin-11-dCTP.

---

De todos los componentes que conformaron la PCR *mix* se observó que la selección del *buffer* era un punto crítico en la amplificación específica del gen *RHD*. El componente principal de cualquier *buffer* de PCR es el  $MgCl_2$ , cofactor necesario para la actividad enzimática de la ADN polimerasa. La concentración óptima de  $MgCl_2$  debe determinarse empíricamente para cada polimerasa, secuencia y par de cebadores. Una concentración no óptima de  $MgCl_2$  puede reducir la eficiencia de amplificación o generar productos inespecíficos, respectivamente. Además, hay que tener en cuenta que la concentración libre de magnesio en el tubo de reacción disminuye proporcionalmente con la de agentes quelantes como el EDTA, los nucleótidos o el propio ADN, quienes también reducen el magnesio libre (Rodríguez *et al.*, 2004). Por ello, se realizaron diferentes pruebas dos buffers de PCR: el QIAGEN 10x PCR Buffer (*Buffer H*) y el 2.05x QIAGEN Multiplex custom buffer (*Buffer Q*) hasta conseguir un resultado óptimo. Posteriormente una vez seleccionado el *buffer* también se comprobó su especificidad con la tecnología Luminex xMAP®. En el apartado de resultados “1.2 Diseño de primers específicos y optimización del buffer de PCR” se puede ver qué buffer fue el seleccionado y los resultados obtenidos con Luminex.

En relación a lo anterior también se evaluó la elección de ADN polimerasa. Se seleccionó la *HotstarTaq ADN polymerase* (QIAGEN) enzima recombinante de alta calidad de 94 kDa (desoxinucleósido-trifosfato: ADN desoxinucleotidiltransferasa, EC 2.7.7.7), originalmente aislado de *Thermus aquaticus* y expresado en *E. coli*. (QIAGEN, 2010). Esta enzima fue seleccionada por la posibilidad de un primer paso de calentamiento (94-95°C) durante 5-10 minutos en el que se activa la ADN polimerasa lo que proporciona una mayor especificidad en la PCR.

En paralelo, también se puso a punto la cantidad de Biotin-11-dCTP, componente incluido en la PCR *master mix*. El objetivo de añadir Biotin-11-dCTP es conseguir marcar los productos de

## Material y Métodos

amplificación con biotina para su posterior revelado con estreptavidina-ficoeritrina (SAPE). Así que el volumen de SAPE también fue modulado junto con la biotina (ver apartado 1.3.3.5 Protocolo de marcaje).

La relación entre el dCTP "frio"(sin biotina)/dCTP "caliente" (Biotin-11-dCTP) se optimizó realizando distintos experimentos hasta ajustar las concentraciones de estos dos componentes. Finalmente, la relación de dCTP frío/dCTP caliente fue de 1:3, en un volumen final de 20µl de PCR. Con el ajuste de esta relación se logró seguir las recomendaciones de Luminex® donde la señal positiva debe ser por lo menos de 2 a 3 desviaciones estándar por encima del ruido de fondo o control negativo (xMAP® de Luminex®, 2018). Se determinaron los valores de corte apropiados para la mínima Median Fluorescence Intensity (MFI) positiva mediante la realización de varios experimentos en los que se procesaron muestras RHD+ y RHD-, así como controles negativos de procesamiento. Se utilizó un intervalo de confianza del 95% para determinar la fiabilidad del valor de corte (Angeloni *et al.*, 2016).

Tras la optimización de los componentes más críticos, la receta del *mix* de PCR (1x) se definió de la siguiente manera:

- Agua: Gibco™ Sterile Distilled Water.
- PCR-buffer: QIAGEN 10x PCR Buffer (cuya composición es: Tris-Cl, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 15mM MgCl<sub>2</sub>).
- *Primers*: IDT (Integrated ADN Technologies).
- dNTPs 100 mM: Jena Bioscience.
- Biotin-11-dCTP 1mM: Jena Bioscience

### C. Optimización del programa de PCR según el modelo de termociclador

---

Una vez optimizada la mezcla final de la PCR se probaron tres modelos de termocicladores distintos disponibles en nuestras instalaciones: **1.-** termociclador Gold plated 96-Well Geneamp® PCR System 9700 (4314878G); **2.-** Aluminum-plated 96-Well Geneamp® PCR System 9700 (4314879G); **3.-** Veriti® 96-Well termociclador (4375786 o4452300).

El programa de la PCR (ver figura 13 y tabla 9) se ajustó a cada uno de los termocicladores para que la reacción de PCR fuese igual de específica y con la misma señal. Para ello se ajustó la velocidad de las rampas, es decir, el cambio de temperatura en el tiempo (°C/segundo) en los modelos Aluminum y Veriti para asemejarlos al termociclador Gold que utiliza un bloque que trabaja a una rampa distinta (ver tabla 8). En los modelos Aluminum y Veriti se ajustó la rampa al 70% (ver figura 13) lo que significa que el termociclador calienta y enfría al 70% de la tasa media máxima, necesario para asemejar la forma en la que calientan y enfrían ambos bloques comparados con el termociclador Gold. Este termociclador fue el usado como referencia porque

## Material y Métodos

versiones anteriores de los test de la familia ID (ID CORE XT e ID HPA) fueron diseñados en este modelo de termociclador y a partir de ahí se fueron incorporando los modelos demandados por los usuarios.

Lo que se pretendió fue buscar la versatilidad para que los futuros usuarios pudiesen usar varios modelos de termocicladores con el mismo programa. Una opción muy demandada por su parte para incorporarla en el día a día de su rutina de trabajo.

**Tabla 8.** Tabla que muestra la velocidad rampa máxima expresada en °C/seg de los modelos de termocicladores Gold, Aluminum y Veriti® 96-Well o Veriti® Dx 96-Well.

Termociclador	Rampa máx
AB 9700 Aluminium	3°C/seg
Veriti® DX 96	3,35 °C/seg
AB 9700 Gold	5 °C/seg



**Figura 13.** Termociclador Gold, Aluminum y Veriti® 96-Well o Veriti® Dx 96-Well, donde se observan las rampas al 70% en el termociclador Aluminum y Veriti.

**Tabla 9.** Programa de PCR común para los 3 modelos de termocicladores.

## Material y Métodos

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<b>Activación enzima</b>	95°C	15 min	1
<b>Desnaturalización</b>	95°C	30 s	40
<b>Anillamiento</b>	60°C	30 s	40
<b>Extensión</b>	72°C	80 s	40
<b>Extensión final</b>	72°C	7 min	1
<b>Mantener</b>	4°C	∞	1

### 1.3.2 Hibridación y Marcaje.

Tras la PCR, los amplificadores se hibridaron con sondas oligonucleotídicas complementarias unidas a microesferas (beads) de color, codificadas según la tecnología xMAP de Luminex®. Esta tecnología está basada en beads de poliestireno de 5.6 micras de diámetro teñidas internamente con proporciones distintas de dos fluoróforos espectralmente diferentes (rojo e infrarrojo). Las características espectrales únicas de cada bead dentro del conjunto que llamamos “bead region” permite que cada tipo de bead sea diferenciado específicamente de todos los demás en un ensayo multiplex (Angeloni *et al.*, 2016).

#### A. Diseño de sondas oligonucleotídicas.

Para la detección específica de los alelos de cada polimorfismo (asumiendo dos alelos por polimorfismo) se utilizan dos sondas, cada una unida a una bead diferente (ver figura 14), una complementaria a la secuencia del alelo A (referencia) y la otra específica para el alelo B (alternativo).

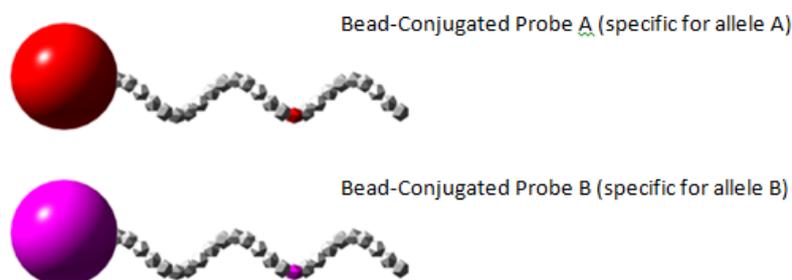


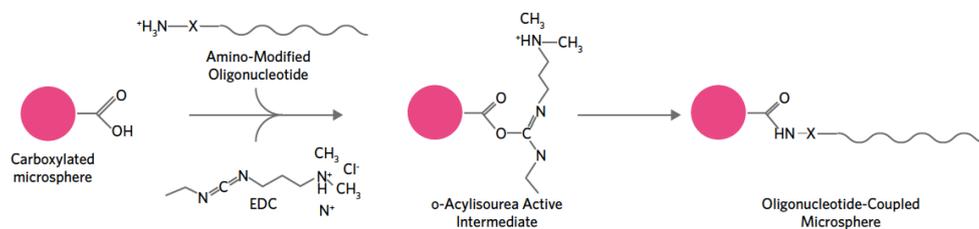
Figura 14. Sondas oligonucleotídicas unidas a microesferas de distinto color (espectro) para detección de polimorfismos.

## Material y Métodos

El diseño de estas sondas se realizó siguiendo las recomendaciones de Luminex® quien aconseja un tamaño entre 18-24 nucleótidos de longitud, en donde el SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) debe situarse en el centro de la secuencia de la sonda. En ciertos casos la mutación se puede colocar de manera descentrada para evitar la formación de estructuras secundarias (Angeloni et al., 2016). Para mejorar la capacidad discriminadora se seleccionaron oligonucleótidos de menor tamaño y para aumentar la señal de hibridación se seleccionaron oligonucleótidos de mayor tamaño ya que se incorpora un número mayor de nucleótido marcado.

En la secuencia del gen *RHD*, cerca del polimorfismo a genotipar, se describen otros polimorfismos *RHD*, pudiendo lo que puede reducir el rendimiento de las sondas. Para prevenir la no hibridación o incluso un genotipo incorrecto, se utilizó inosina en las posiciones de nucleótidos de estos polimorfismos extras. El "enfoque inosina" se ha utilizado anteriormente en el diseño ID CORE XT (Progenika Biopharma, a Grifols Company) test de diagnóstico que determina 37 antígenos de 10 grupos sanguíneos distintos, con resultados exitosos.

Por otro lado, las sondas deben de tener un grupo amino primario en el extremo 5', para así acoplarse al grupo carboxilo de la bead que es activado mediante tratamiento con EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride). De esta manera se forman enlaces covalentes entre el grupo carboxilo de las beads y las aminas primarias de las sondas (Figura 15) (Angeloni et al., 2016).



**Figura 15. Grupo carboxilo de las microesferas unido al grupo amino de las sondas oligonucleotídicas mediante EDC.**

A la hora de diseñar las sondas se tuvo en cuenta que los SNPs a determinar podían estar próximos entre sí. En este caso, una sonda diseñada para detectar un SNP concreto podría solapar a otra posición nucleotídica asimismo polimórfica. Así, la presencia de un segundo polimorfismo podría provocar una hibridación y una especificidad subóptima de la sonda a la región diana. Para solventar este problema, se diseñaron sondas en que incorporaron la inosina en la posición correspondiente al polimorfismo que interfiere en la detección del polimorfismo interrogado por el test. De este modo se consiguió que en estos casos la señal fuera superior a la mínima y así discriminar correctamente los 3 genotipos posibles por bialélico (homocigoto frecuente, homocigoto infrecuente y heterocigoto). La señal o MFI (Median Fluorescence

## Material y Métodos

Intensity) tenía que ser superior a la mínima establecida con las muestras D- o controles negativos.

Mirando la temperatura de hibridación de cada una de la sonda, se eligió la temperatura de 52°C para todas las sondas ya que se trataba de una hibridación múltiple. Para aquellas sondas en las que a esta temperatura su discriminación o su señal empeoraba, se rediseñaron sondas para conseguir suficiente señal y especificidad en la detección de todos los polimorfismos.

Todas las sondas fueron sintetizadas por IDT (Integrated ADN Technologies) y cuantificadas mediante un espectrofotómetro (NanoDrop™ 8000 Spectrophotometer - Thermo Fisher Scientific) para confirmar que su concentración es óptima (70-130 µM) para realizar los conjugados correspondientes (ver siguiente sección).

### B. Protocolo de conjugados

---

Los conjugados son el resultado del proceso de unión del grupo amino primario en el extremo 5', al grupo carboxilo de la bead que es activado mediante tratamiento con EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride).

El protocolo de conjugados recomendado por Luminex®, especifica un volumen de partida de 500 µl de beads, pero en nuestro caso éste se escaló y se adaptó a un volumen de 1 ml, ya que se estimó que era más costoso, tanto en material como en tiempo, repetir el proceso de generación de conjugados que incrementar el volumen de reacción. Es decir, el volumen obtenido tras el proceso de generación de los conjugados se utiliza para conformar la Bead Master Mix (BMM). Si no se hubiera realizado el escalado, teniendo en cuenta la frecuencia de fabricación estimada por parte del departamento de Producción en relación al consumo previsto de lotes, el gasto de los conjugados se produciría en un breve periodo de tiempo, lo que supondría repetir el proceso, y por consiguiente un mayor gasto que el propio beneficio obtenido por lote.

Como punto de partida se duplicaron todos los volúmenes del protocolo de Luminex®, (Protocol 5.2.1: Nucleic acid coupling; figura 16) y tras múltiples ensayos, finalmente, se obtuvo un protocolo en el que comparando las señales y discriminación de las variantes a testar entre ambos protocolos los resultados fueron semejantes.

## Material y Métodos

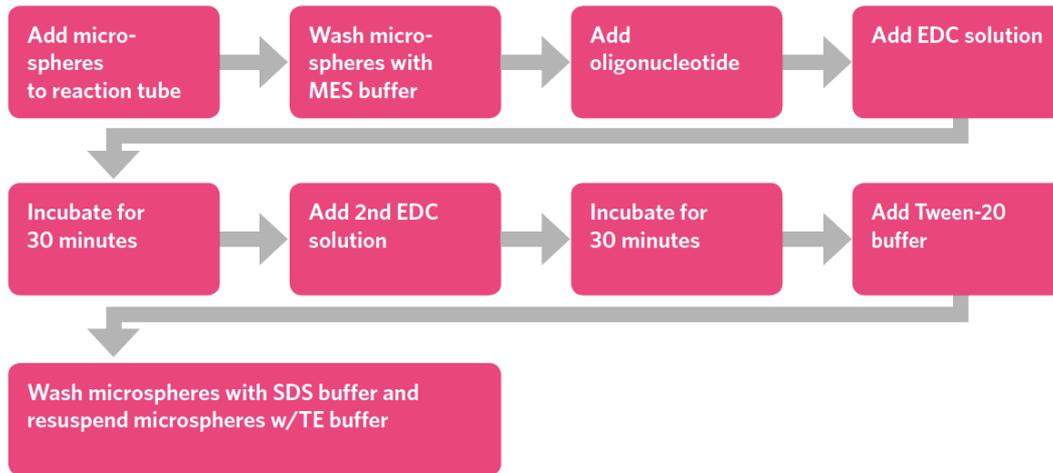


Figura 16. Resumen del protocolo de fabricación de los conjugados propuesto por Luminex® (Protocol 5.2.1: Standard Nucleic Acid Coupling to xMAP Microspheres).

Uno de los pasos más críticos del protocolo fue la adición del 1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride (EDC). Por ello, se realizaron una serie de pruebas en este paso. Una de las pruebas fue contabilizar el tiempo transcurrido desde la adición del EDC al primer tubo hasta el último (número total 14 conjugados), ya que el tiempo transcurrido podría influir en la mayor o menor eficiencia de la conjugación. Otra fue utilizar el buffer MES ((2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, buffer esencial para la eficiencia del proceso de acoplamiento sonda-bead mediante el EDC) en vez de agua para resuspender el EDC ya que de igual manera la conjugación podría verse afectada. Y, por último, consideramos el utilizar alícuotas de un solo uso respecto a un stock con varias aperturas.

En el apartado de Resultados “1.5 Protocolo de conjugados o couplings” se pueden ver toda la optimización de este protocolo. Una vez definido, se procedió a elaborar todos los conjugados de las sondas correspondientes a los SNPs de las variantes previamente seleccionadas (**Tabla 10**).

Tabla 10. Tabla que recoge el listado de las sondas conjugadas con sus correspondientes beads-type.

Polimorfismo testado	Sonda	Nº Bead
<i>RHD:c.8G</i>	R00130101R	B033
<i>RHD:c.8C</i>	R00130201R	B034
<i>RHD:c.807G</i>	R00560101R	B035

## Material y Métodos

<i>RHD:c.807T</i>	R00560201R	B036
<i>RHD:c.809G</i>	R00580101R	B037
<i>RHD: c.809T</i>	R00580201R	B038
<i>RHD:c.1154C</i>	R00800101R	B042
<i>RHD:c.1154G</i>	R00800201R	B043
<i>ITGB3:c.176T</i>	R01170103R	B044
<i>ITGB3:c.176C</i>	R01170203R	B045
<i>RHD-CE-D hybrid</i>	R01930101R	B046
<i>RHD-CE-D no hybrid</i>	R01930201R	B047
<i>HGH</i>	R01940101R	B051
<i>HGH</i>	R01940201R	B052

---

Las microesferas están teñidas internamente con diferentes proporciones de fluoróforos rojos e infrarrojos. Las diferentes concentraciones de los colorantes internos permiten producir una matriz de 100 microesferas espectralmente distintas es denominamos “bead región” o mapa de beads. En la **Figura 17**, aparece marcado en color amarillo las beads recomendadas por Luminex®, que son aquellas localizadas en el centro del mapa, evitando los extremos, y así optimizar su correcta clasificación en la “bead region”.

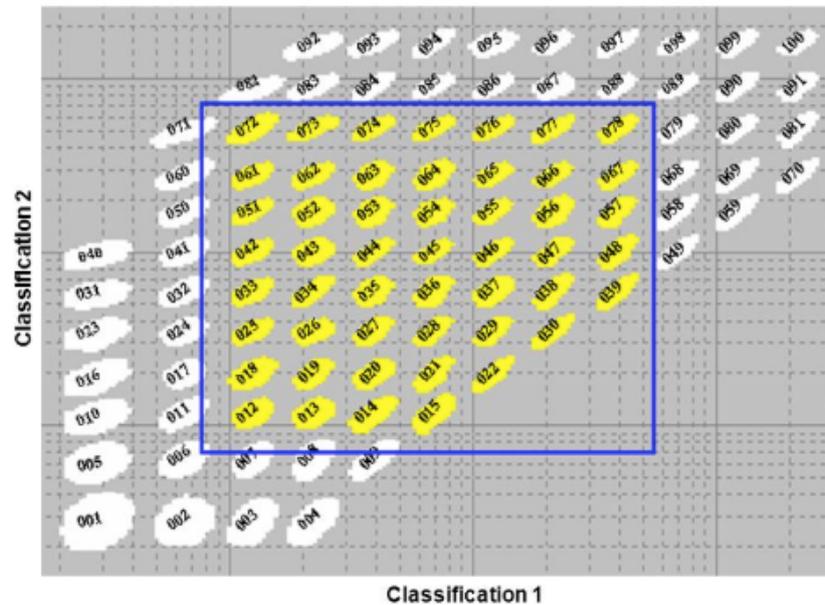


Figura 17. Mapa de beads del Luminex® 100/200™. El mapa de beads son las 100 microesferas distintas que se pueden utilizar para realizar los conjugados. Cada bead teñida internamente con una proporción distinta de dos fluoróforos permite su diferenciación. En amarillo están marcadas las microesferas recomendadas por Luminex.

### C. Protocolo de fabricación de la Bead Master Mix (BMM)

---

La BMM se conformó con cada uno de los conjugados. Para ello se continuó con el protocolo descrito en el manual de Luminex® (Protocol 5.2.2: Oligonucleotide coupling confirmation). En este protocolo se utiliza el buffer de hibridación compuesto por TMAC (Tetramethylammonium chloride) al 1.5X (4.5 M). El TMAC estabiliza los pares de bases AT y CG, minimizando el efecto de la composición de bases en la hibridación y, por lo tanto, permite utilizar las mismas condiciones de hibridación pese a usarse sondas con diferentes temperaturas de fusión (Fitzgerald *et al.* 2007, Das *et al.*, 2006, Wilson *et al.*, 2005).

### D. Protocolo de hibridación

---

La hibridación entre los productos de PCR y las beads unidas a las sondas (conjugados) se llevó a cabo en termociclador. La temperatura óptima de hibridación para cada sonda se determinó con la herramienta disponible en la web <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>, la cual proporciona temperatura de melting ( $T_m$ ) de una sonda oligonucleotídica (Figura 18). Como se comentó en el apartado "1.3.2 Hibridación y marcaje. A) Diseño de sondas oligonucleotídicas", la temperatura de hibridación se definió en 52°C para todas las sondas al ser una hibridación múltiple y para conseguirlo se fue diseñando sondas que tuviesen conseguir suficiente señal (MFI) y especificidad en la detección de todos los polimorfismos.

## Material y Métodos

**Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator**

Enter Oligonucleotide Sequence Below  
*OD calculations are for single-stranded DNA or RNA*

Nucleotide base codes

GTG AGC CCA GAG GCA ATC

Reverse Complement Strand(5' to 3') is:  
GAT TGC CTC TGG GCT CAC

5' modification (if any)      3' modification (if any)      Select molecule

Biotin           ssDNA

50 nM Primer      1 Measured Absorbance at 260 nanometers

50 mM Salt (Na<sup>+</sup>)

**Calculate**      **Swap Strands**      **BLAST**      **mfold**

---

**Physical Constants**      **Melting Temperature (T<sub>M</sub>) Calculations**

Length: 18      Molecular Weight: 5938.6<sup>4</sup>      GC content: 61%      1 52.6 °C (Basic)

1 ml of a sol'n with an Absorbance of 1 at 260 nm      2 58.4 °C (Salt Adjusted)

is 4.997 microMolar<sup>5</sup> and contains 29.7 micrograms.      3 51.31 °C (Nearest Neighbor)

**Thermodynamic Constants Conditions: 1 M NaCl at 25°C at pH 7.**

RlnK 33.404 cal/(°K\*mol)      deltaH 147.5 Kcal/mol

deltaG 23.6 Kcal/mol      deltaS 383.3 cal/(°K\*mol)

**Deprecated Hairpin/self dimerization calculations**

5 (Minimum base pairs required for single primer self-dimerization)

4 (Minimum base pairs required for a hairpin)

**Check Self-Complementarity**

Figura 18. Ejemplo de la temperatura de melting (T<sub>m</sub>) obtenido con en la herramienta Oligocalc. El recuadro rojo muestra el resultado calculado por el programa.

El protocolo de hibridación quedo definido como muestra la figura 19.

	Temperatura	Tiempo (minutos)
<b>Desnaturalización</b>	95 °C	02:00
<b>Hibridación</b>	52 °C	30:00
<b>Mantenimiento a 52°C</b>	52 °C	∞

Figura 19. Detalles de tiempos y temperaturas del programa de hibridación.

### E. Protocolo de marcaje

Para el análisis de las microesferas, Luminex utiliza dos láseres. El láser / LED de clasificación roja (635 nm) excita los tintes fluorescentes internos de las microesferas, identificando cada una de las microesferas de acuerdo con su firma espectral. Y si el analito de interés está presente, el láser / LED indicador verde (525–532 nm) reconoce el indicador fluorescente unido al analito

## Material y Métodos

capturado en la superficie de la microesfera (Reslova *et al.*, 2017). Por eso, en nuestro protocolo de marcaje se utiliza como marcador fluorescente el estreptavidina - ficoeritrina (*streptavidin-ficoeritrin* (SAPE), por su extremadamente alta afinidad de unión con la biotina.

La estreptavidina es una proteína tetramérica aislada de la bacteria *Streptomyces avidinii* que tiene una afinidad de unión extremadamente alta para la biotina ( $K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$ ). La ficoeritrina es una macromolécula biológica perteneciente a la familia de las ficobiliproteínas con aplicaciones en diversos sectores industriales como consecuencia de sus extraordinarias propiedades espectroscópicas, tanto absorciométricas como fluorimétricas. En concreto, su elevado coeficiente de extinción molar a 540 nm le confiere, un intenso color rosa brillante muy apropiado para su empleo como colorante natural, mientras, que su alto rendimiento cuántico de fluorescencia permite su detección con mayor sensibilidad que otros fluorocromos convencionales. Atendiendo a sus propiedades espectroscópicas de absorción las ficoeritinas presentan el máximo de absorción es a 566 nm y el máximo de emisión a 578 nm.

La elevada afinidad por la biotina de la estreptavidina combinada, con la intensa señal de fluorescencia de la ficoeritrina hace que los conjugados SAPE se encuentren entre los reactivos de detección de fluorescencia más sensibles (Hingorani *et al.* 2008). Este marcaje se realizó a la misma temperatura que la hibridación ya que mantener la temperatura optimiza la proporción señal específica / fondo o *background* que posteriormente se obtiene con el Luminex® 200™. Es decir, la proporción entre los valores de Median Fluorescence Intensity (MFI) obtenidos en muestras positivas (muestra que presenta las variantes génicas analizadas con el test) y los fondos (muestras negativas). Además, se realizaron pruebas para determinar el volumen de SAPE adecuado por muestra sin que proporción señal específica/ fondo o *background* se viese descompensada, es decir, sin que se viese afectada la discriminación de los genotipos. La premisa a la hora del análisis fue que los valores de MFIs obtenidos entre muestras positivas para cada una de las variantes y los fondos o *background* (muestras negativas) tuviesen la mejor relación MFI/discriminación.

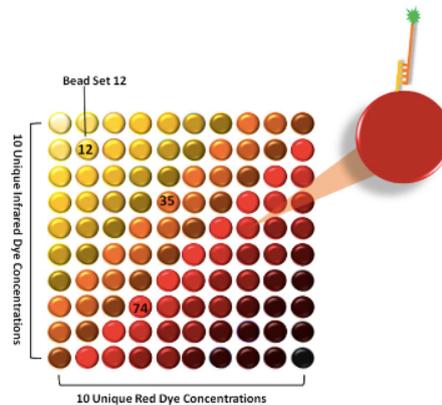
También se realizaron experimentos comparando la homogeneidad en las señales obtenidas entre el principio y el final de la placa, es decir, se analizó la intensidad obtenida en los primeros 8 pocillos de la placa y en los 8 últimos. Esto es un punto importante a la hora de elegir la cantidad de SAPE porque los valores de las MFIs obtenidas en una misma muestra entre el pocillo 1 y el 96 fueron distintos y en todos los casos, incrementándose la señal en el pocillo 96 respecto al 1, lo que podría afectar a la discriminación. Se analizaron todos los genotipos de las variantes alélicas detectadas con el test en el pocillo 1 y 96 y en todos los casos, a pesar del incremento de señal en el pocillo 96, los genotipos fueron correctos.

## Material y Métodos

Tras la hibridación entre los productos de PCR, previamente amplificados mediante PCR utilizando biotin-dCTP, con las sondas oligonucleotídicas unidas a las microesferas de Luminex®, se realizó el marcaje mediante el SAPE.

### 1.3.3 Detección de la señal con la tecnología Luminex® 200™.

La tecnología xMAP® actúa como un citómetro de flujo y se basa en un conjunto de diferentes microesferas en suspensión como determinantes de la especificidad del analito. Como hemos comentado anteriormente, los conjuntos de microesferas se tiñen internamente con dos fluoróforos espectralmente diferentes. La firma espectral es única para cada conjunto de microesferas y está determinada por diferentes proporciones de tintes internos, lo que produce una serie de 100 conjuntos de microesferas espectralmente distintas (Figura 20) (Reslova *et al*; 2017).



**Figura 20. Conjunto 100 microesferas que conforman la población de esferas distintas teñidas internamente con diferentes concentraciones de fluoróforos rojos e infrarrojos.**

Un primer láser rojo (635 nm) dentro del analizador Luminex® 200™ excita los tintes fluorescentes internos de las microesferas, identificándolas de acuerdo con su firma espectral. Si el analito de interés está presente, un segundo láser (esta vez verde / LED 525–532 nm) reconoce el indicador fluorescente unido al analito capturado en la superficie de la microesfera. Es decir, el láser verde detecta la emisión de fluorescencia procedente del conjugado fluorescente unido al producto de ADN amplificado marcado con biotina, complementario a la sonda de cada bead. El instrumento registra docenas de lecturas para cada conjunto de beads y produce un resultado distinto para cada analito en la muestra. Por cada tipo de bead (alelo testado) se obtuvo la MFI (Median Fluorescence Intensity) emitida por un número preestablecido de conteo de beads (parámetros ajustados en software xPONENT® 3.1 de análisis de Luminex® 200™) (Figura 21).

## Material y Métodos

### 1.3.4 Análisis de los resultados mediante software desarrollado para el test ID RHD XT.

Los valores de MFIs (Median Fluorescence Intensity) que se obtuvieron para cada uno de los conjugados (Bead + Sonda) se utilizaron para realizar una proporción (ratio) con la que se establecieron los 3 posibles genotipos de cada polimorfismo: homocigoto para el alelo A (AA); heterocigoto (AB) y homocigoto para el alelo B (BB).

La premisa a la hora del análisis fue que los valores de MFIs obtenidos entre muestras positivas para cada una de las variantes y los fondos o *background* (muestras negativas) tuviesen la mejor relación MFI/discriminación. Para satisfacer esta premisa, se analizaron muestras de ADN procedentes de líneas celulares del *Coriell Institute for Medical Research* que presentasen cada una de las variantes analizadas con el test.

Los datos brutos del sistema Luminex® (archivos csv que contienen el valor MFI para cada tipo de beads) se procesaron con un software desarrollado específicamente para determinar un genotipo y predecir un fenotipo de cada grupo sanguíneo (Figura 22).

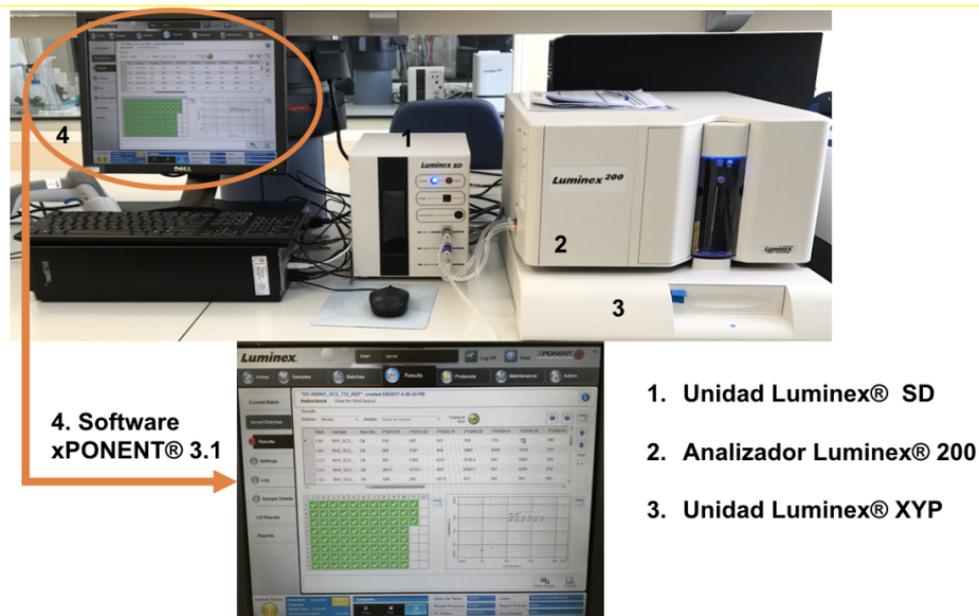


Figura 21. Luminex® 200™ que está formado por tres unidades: el analizador Luminex® 200™, la unidad Luminex® SD y la unidad Luminex® XYP.

# Material y Métodos

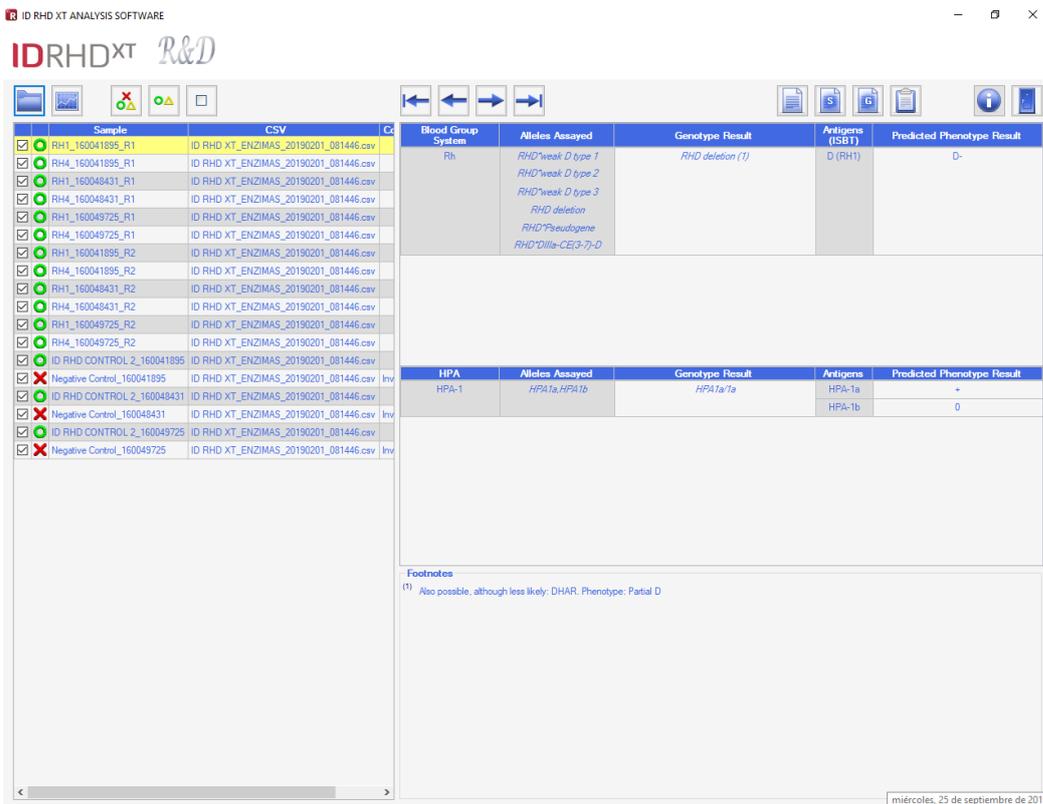


Figura 22. Software de análisis para determinar el genotipo y el fenotipo de las muestras analizadas con ID RHD XT.

El procesamiento con software consistió en realizar tres pasos consecutivos: 1.- Determinar el ratio de presencia o ausencia de cada exón del gen *RHD*, 2.- Determinar el ratio de MFI a partir del polimorfismo presente de cada exón del gen *RHD*, 3.- Determinar uno de los 3 posibles genotipos [homocigoto para el alelo A (AA); heterocigoto (AB) y homocigoto para el alelo B (BB)] a partir del ratio obtenido en el punto 2. Con la información obtenida tras estos tres pasos, se infieren finalmente tanto el genotipo como el fenotipo de las muestras procesadas con el test D RHD XT.

Cabe notar que los valores de MFI obtenidos para cada uno de los polimorfismos de *RHD* interrogados por el test se normalizaron utilizando los valores de MFI obtenidos de los controles internos de amplificación (HGH y HPA 1), obteniendo un ratio de presencia o ausencia. Este valor de ratio determinó la ausencia o presencia de cada exón del gen *RHD* (Figura 23).

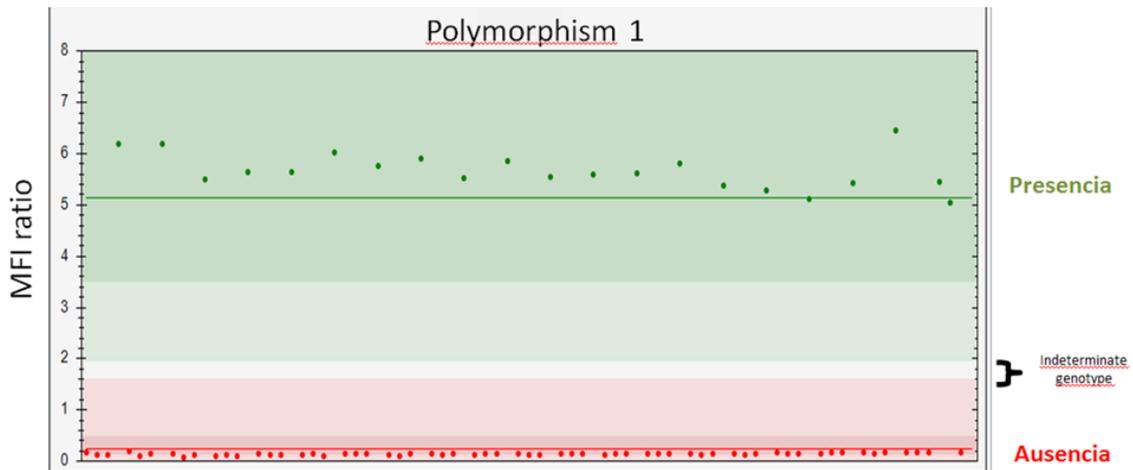


Figura 23. Gráfica de clasificación de presencia (zona verde) o ausencia (zona roja) de la variante testada obtenida con el software de análisis desarrollado para el test ID RHD XT. La región blanca se corresponde a una región de indeterminación genética. Si el ratio obtenido determina ausencia del exón, los polimorfismos correspondientes no siguen el proceso de análisis de genotipado ya que se considera que existe una delección del exón.

Sólo si el ratio obtenido determina presencia del exón, a continuación, se determinan los 3 posibles genotipos de cada polimorfismo: homocigoto para el alelo A (AA); heterocigoto (AB) y homocigoto para el alelo B (BB). Un ejemplo se puede observar en la Figura 14, donde cada punto de datos representa una muestra. Las muestras cuyo ratio de MFI para el polimorfismo 1 estuvieron dentro de la sección de color verde (ratio MFI  $\geq 0.76$ ) fueron genotipadas como homocigotas para el alelo común (AA); muestras cuyo ratio de MFI para el polimorfismo 1 estuvieron dentro de la sección azul (ratio MFI de 0.28 a 0.70) fueron genotipadas como heterocigoto (AB) y las muestras cuyo ratio de MFI para el polimorfismo 1 estuvieron dentro de la sección roja (ratio MFI  $\leq 0.23$ ) fueron genotipadas como homocigoto para el alelo variante (BB). Las muestras que estuvieron dentro de las secciones blancas (ratio MFI de 0.70 a 0.76 o de 0.23 a 0.28) se clasificaron como "genotipo indeterminado". Estas gráficas se obtuvieron para cada una de las variantes que se incluyeron en el test (Figura 24).

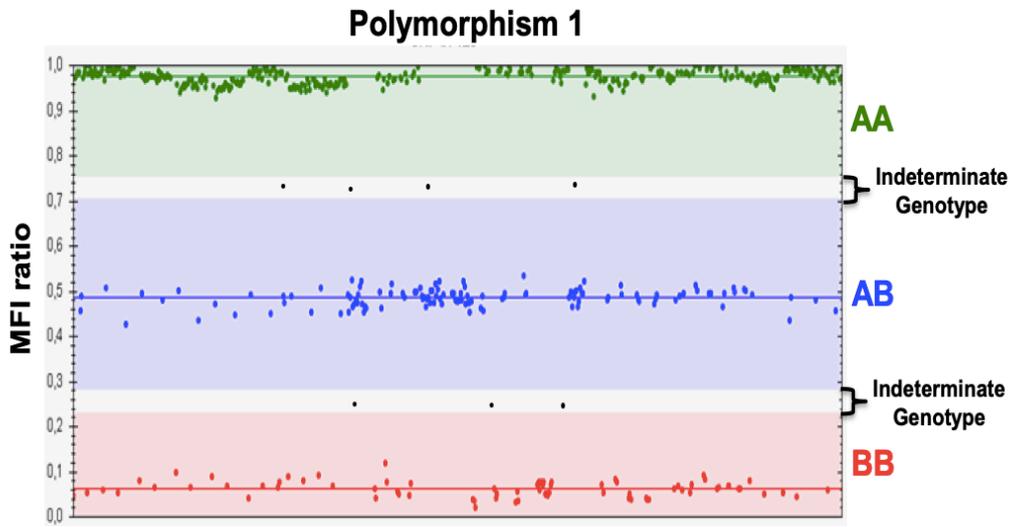


Figura 24. Gráfica de clasificación de cada uno de los 3 genotipos posibles (homocigoto alelo común, homocigoto alelo variante, heterocigoto) obtenida con el software de análisis desarrollado para el test ID RHD XT.

Para cada uno de los Probe Sets (PS) se procesaron al menos 120 muestras de ADN de cada uno de los genotipos. En la medida de lo posible cada uno de esos datos procedió de muestras distintas, pero en algunos grupos debido a la baja frecuencia de algunos polimorfismos, se utilizaron réplicas de las mismas muestras para llegar a los 120 valores. En cada placa se incluyeron controles negativos de procesamiento (agua) y los controles sintéticos (ID RHD CONTROL 1 e ID RHD CONTROL 2) como controles positivos.

### A. Robustez de la flexibilidad.

---

Para evaluar la flexibilidad de los resultados frente a diferentes parámetros distorsionadores, se consideraron variables que potencialmente podían afectar a los ratios de genotipado como eran: diferentes concentraciones de ADN (0.05-200 ng /  $\mu$ l) en muestras ausentes, que son las que podrían hibridar de forma inespecífica, estudio detallado en la "Fase 3: Validación del test: apartado 3.3 Estudio de detección del límite inferior" y "3.4 Estudio de detección del límite superior". Diferentes termocicladores detallado en la "Fase 3: Validación del test: apartado 3.5 Estudio de verificación de termocicladores". Diferentes condiciones en el protocolo (cambios en volúmenes, en temperaturas) descrito en la "Fase 3: Validación del test: 3.8 Estudio de tolerancia a la variabilidad en el protocolo (Guard banding)". También diferentes operadores (se consideraron los resultados producidos con las mismas muestras procesadas por 3 personas distintas), diferentes días (6), diferentes laboratorios (3), lo que se explica en detalle la "Fase 3: Validación del test: apartado: 3.9 Estudio de reproducibilidad".

## Material y Métodos

### B. Análisis estadístico y optimización del algoritmo de genotipado para un de análisis automático de los datos.

Con todos los datos generados de las 120 muestras de ADN de cada uno de los genotipos de cada PS se calcularon los límites de genotipado para cada uno de los grupos [homocigoto alelo A (AA); heterocigoto (AB) y homocigoto alelo B (BB)], sus mínimas MFIs para cada sonda y la XMFI (Promedio de la *Median Fluorescence Intensity*). Este análisis fue realizado por el departamento de IT, y que posteriormente, se usarían en el diseño del software de análisis.

#### B.1) Límites de clúster para el genotipo

Lo primero que realizó el departamento IT fue crear una distribución teórica por alelo y averiguar si era una distribución "normal" (Test Shapiro) o "no paramétrica". Una vez que se estableció el elemento de distribución, se calculó el percentil 99 y 95 de la curva para el BB homocigoto (grupo 1), el percentil 1 y 5 de la curva para el AA homocigoto (grupo 3), y el percentil 0.5 y 2.5 y el percentil 99.5 y 97.5 para el heterocigoto AB (grupo 2), ya que se tuvo en cuenta ambos lados de la distribución (por lo que la distribución va a las zonas "no call" o genotipo incorrecto, por lo tanto, la suma de las dos colas no puede ser más de 5% o 1% respectivamente) (Figura 25).

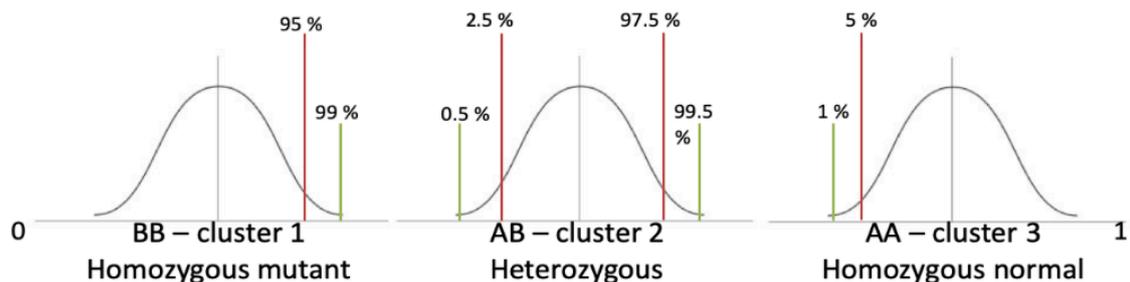


Figura 25. Representación de los 3 clusters, la curva de distribución teórica y sus percentiles.

Si tuviéramos en cuenta en los grupos toda la variación real que ocurrirá durante la vida útil del test, el valor de corte entre los grupos podría ser solo el calculado por los percentiles de las curvas representadas en la Figura 24, lo que no sería preciso, ya que independientemente de la cantidad de observaciones incluidas en la curva, sabemos que hay cierta variabilidad que aún no se ha tenido en cuenta. Por lo tanto, se permitió un cambio teórico (valor delta " $\Delta$ ") antes de que las curvas entren en las zonas de No call (genotipado incorrecto).

Para calcular ese cambio teórico (y con ellos los puntos de corte) hay dos criterios que debemos cumplir: (Figura 26).

# Material y Métodos

1. La cola de la distribución que cruza el umbral "No call" más cercano no puede ser superior al 5%
2. La cola que va al otro grupo no puede ser más del 1%.

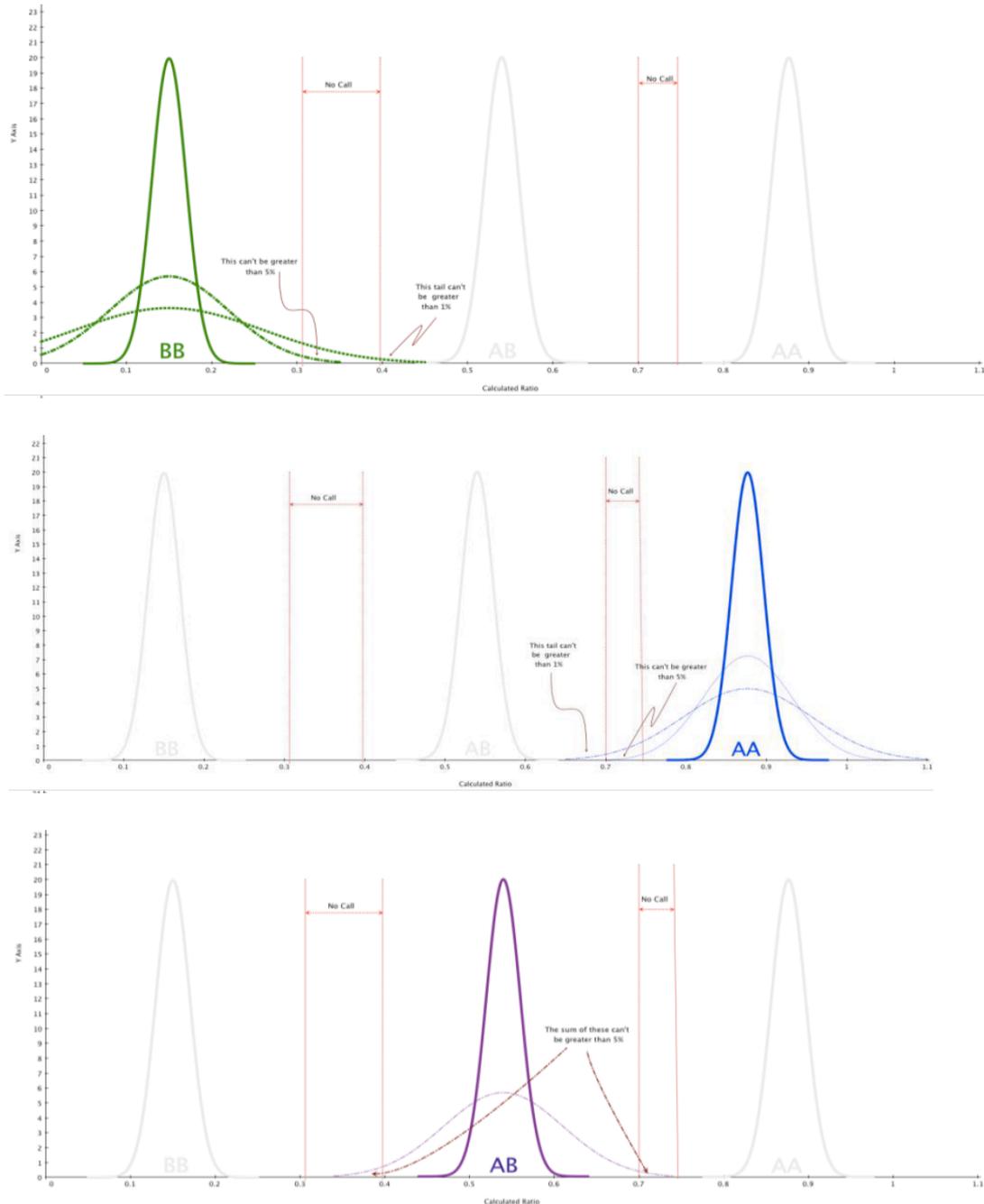


Figura 26. Representación de los 3 grupos, la curva de distribución teórica y sus percentiles.

Como no podemos predecir el desplazamiento exacto de los grupos, calcularemos cada uno de ellos utilizando las siguientes ecuaciones.

## Material y Métodos

$$-(\text{Percentile } 95)_{\text{cluster } 1} + \Delta_1 = (\text{Percentile } 0.5)_{\text{cluster } 2} - \Delta_1$$

$$-(\text{Percentile } 2.5)_{\text{cluster } 2} - \Delta_2 = (\text{Percentile } 99)_{\text{cluster } 1} + \Delta_2$$

$$-(\text{Percentil } 97.5)_{\text{cluster } 2} + \Delta_3 = (\text{Percentile } 1)_{\text{cluster } 3} - \Delta_3$$

$$-(\text{Percentil } 5)_{\text{cluster } 3} - \Delta_4 = (\text{Percentile } 99.5)_{\text{cluster } 2} + \Delta_4$$

Resolver el "delta" nos dio el cambio permitido entre grupos:

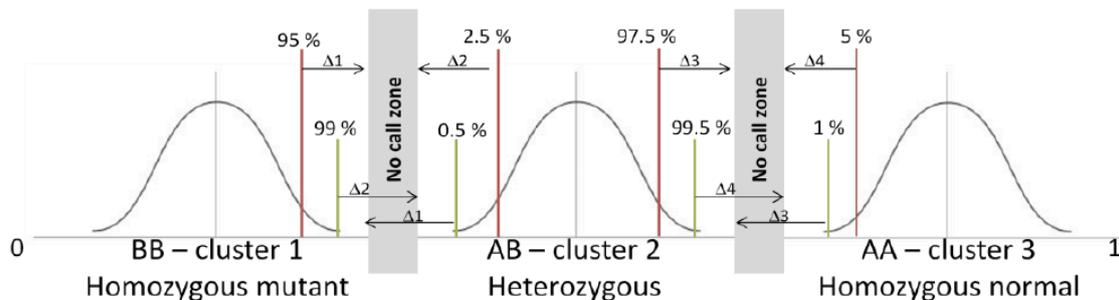
$$-\Delta_1 = [(\text{Percentil } 0.5)_{\text{cluster } 2} - (\text{Percentile } 95)_{\text{cluster } 1}] / 2$$

$$-\Delta_2 = [(\text{Percentile } 2.5)_{\text{cluster } 2} - (\text{Percentile } 99)_{\text{cluster } 1}] / 2$$

$$-\Delta_3 = [(\text{Percentil } 1)_{\text{cluster } 3} - (\text{Percentile } 97.5)_{\text{cluster } 2}] / 2$$

$$-\Delta_4 = [(\text{Percentil } 5)_{\text{cluster } 3} - (\text{Percentile } 99.5)_{\text{cluster } 2}] / 2$$

Este cambio permitido se agregó o se restó al percentil correspondiente para configurar el valor de corte. La zona de "No call" es el área entre esos límites (Figura 27).



**Figura 27. Representación de los 3 grupos, la curva de distribución teórica y sus percentiles, los cambios teóricos (Δ) y las zonas No call.**

Desde nuestro departamento, I+D, tanto en el proceso de cálculo de los límites de genotipado como una vez determinados fuimos supervisando los pasos que siguieron y así gestionar conjuntamente el tratamiento de los datos teniendo en cuenta los genotipos conocidos de las muestras. Se fue valorando el efecto de esos límites calculados en cada uno de los Probe Sets (PS) para cada uno de los 3 posibles genotipos (genotipos homocigoto frecuente (3), heterocigoto (2) y homocigoto infrecuente o mutante (1)).

### B.2) Mínima MFI para genotipado

---

Para calcular la mínima MFI necesaria para un genotipado preciso de cada uno de los grupos, se obtuvo los valores de fluorescencia de fondo o *background* no específica de cada una de las sondas mediante los controles negativos procesados en cada placa.

Con esos datos, en el departamento IT se generó una base de datos y a partir de ahí se creó una distribución teórica por sonda (MFI1 y MFI2 por conjunto de sonda) y se analizó si la distribución era "normal" (Test de Shapiro) o "no paramétrica". Una vez que se estableció el elemento de distribución, se calculó el percentil 99 de la curva. Esto dio el valor de la mínima MFI. La cola de distribución que cruza con un resultado válido (por encima de la mínima MFI) no puede ser más del 1%.

Además, se utilizó el promedio de las MFIs mínimas de PS117 y PS194 para establecer el límite de test válido.

Una vez establecidos los límites de genotipado y las mínimas MFI, el departamento de IT generó el software de análisis automático de ID RHD XT, el cual usa una tabla de referencias cruzadas para predecir los genotipos y fenotipos de los grupos sanguíneos Rh y HPA-1. La tabla de referencias cruzadas se desarrolló basándose en la literatura científica publicada.

## Fase 2: Desarrollo del prototipo

El objetivo de esta fase consistió en evaluar la robustez del proceso de fabricación del kit, ID RHD XT, e identificar los parámetros críticos que pudiesen tener un impacto en la calidad del test (**2.1 Optimización de las condiciones de fabricación**).

Para ello, se fabricaron 2 lotes de ID RHD XT que posteriormente se usaron en la "Fase 3: Validación del test". El primer lote fue fabricado en el departamento I+D y sirvió, por un lado, como aprendizaje para el departamento de producción (cómo fabricar) y, por otra parte, para implementar posibles mejoras propuestas por este departamento en la producción de los distintos componentes a escala industrial. En las fabricaciones se utilizaron lotes de materia prima necesaria para fabricar todos los componentes que forman parte de un kit de ID RHD XT (PCRMM, BMM, SAPE y SAPE DILUTION BUFFER) distintos entre sí, dentro de la disponibilidad que tuviese el proveedor, para testar la máxima variabilidad posible.

También se definieron los controles de calidad (**2.2 Determinación de controles de calidad**) realizados a los distintos componentes, tanto a los componentes finales que conformaban el kit (PCR Master Mix (PMM), Bead Master Mix (BMM), SAPE y SAPE Dilution Buffer) como, a los reactivos intermedios necesarios para su fabricación. Esta fase, al igual que la de fabricación, se llevó a cabo por parte del departamento I+D, y se determinaron los parámetros a los que se

## Material y Métodos

evaluó su control de calidad. En esta etapa también se involucró al departamento QC (Quality Control) como parte de su formación como futuro responsable de la liberación de los lotes fabricados.

El primer lote se realizó siguiendo las instrucciones propuestas en los borradores de los documentos denominados protocolos de producción (PPR), que son los documentos necesarios para la futura fabricación del test por parte del departamento de producción. Estos documentos describían los pasos a seguir para la elaboración de los distintos componentes incluidos los reactivos intermedios que conformaban los distintos componentes.

También se realizaron los borradores de los documentos llamados PQC (Protocols Quality Control) necesarios por el departamento QC para efectuar los distintos controles de calidad a cada uno de los componentes o reactivos intermedios considerados críticos en el proceso de fabricación.

Ambos documentos eran necesarios para fabricar según Normas de Correcta Fabricación (NCF) o GMPs (Good Manufacturing Practices), es decir, normas que garantizan la calidad, el control y la uniformidad en el proceso de fabricación (AEMPS, 2018).

Finalizada la fabricación y liberación del primer lote, y habiendo cumplido todos los controles de calidad exigidos, se realizaron las mejoras propuestas por cada uno de los departamentos involucrados (Departamento de Producción y Departamento QC) en los documentos borradores (PPRs y PQCs) y así concluirlos.

Así, esta etapa denominada de “transferencia”, se dio por finalizada por parte del departamento de I+D, quien traspaso a los departamentos de Producción y QC, la responsabilidad en la fabricación y liberación de los sucesivos nuevos lotes.

---

### 2.1 Optimización de las condiciones de fabricación

En esta tarea, como su propio nombre indica, se definieron los requisitos para producir el test ID RHD XT a escala industrial para su futura comercialización.

La primera tarea fue calcular el número de determinaciones que se podían realizar con un kit de ID RHD XT, un kit lo conforman los cuatro componentes PCR Master Mix (PMM), Bead Master Mix (BMM), SAPE y SAPE Dilution Buffer. Este número fue una estimación del consumo o gasto que los futuros usuarios iban hacer del test. Esta estimación fue realizada por dos departamentos de manera independiente, el departamento comercial y el de soporte, es decir, quienes tienen una relación directa con los usuarios. El número quedó definido en 24 reacciones/test.

## Material y Métodos

A partir de este número se definieron los volúmenes necesarios para cada uno de los componentes, es decir, las cantidades que tenían que contener cada uno de los viales que conforman el test. Y a partir de estos cálculos se definieron las cantidades mínimas y máximas de fabricación de cada uno de los componentes, es decir, se determinó el tamaño menor y mayor de un lote.

Así con el primer lote se validó el tamaño más pequeño de fabricación (40 kits) y el segundo lote, el tamaño mayor (160 kits). Para cada uno de los componentes que constituían el kit se redactó su protocolo con los pasos detallados a seguir, volúmenes añadir, etc.

---

### 2.2 Determinación de controles de calidad a incluir con cada kit comercializado

Se definieron los controles de calidad para los distintos componentes, tanto para los componentes finales que conformaban el kit (PCR Master Mix (PMM), Bead Master Mix (BMM), SAPE y SAPE Dilution Buffer) como, para los reactivos o materias intermedias necesarias para fabricar estos componentes. Estos controles de calidad que, a continuación, se detallan, se describieron en los borradores de los llamados PQC's (Quality Control Protocols), documentos requeridos por el departamento QC (Quality Control).

---

#### 2.2.1 Oligonucleótidos (Primers. Sondas y Antisondas)

Los primers utilizados para la fabricación de la PCR Master Mix (PMM), las sondas para la fabricación de los conjugados y, por último, las antisondas, las secuencias reversas complementarias con el extremo 5' modificado con biotina, utilizadas para el control de calidad de los conjugados.

Todos estos oligonucleótidos se verificaron sus concentraciones en un espectrofotómetro (NanoDrop™ 8000 Spectrophotometer - Thermo Fisher Scientific) proceden del proveedor IDT (Integrated DNA Technologies) fueron enviados resuspendidos en agua a una concentración 100 µM. El rango establecido como criterio de aceptación dependió del valor de concentración mínimo y máximo obtenido en la cuantificación de 4 lotes diferentes con un total de 204 medidas. Estos 204 datos estuvieron distribuidos en un primer lote n: 46, un segundo lote n: 50, un tercer lote n: 58 y un cuarto lote n: 50. La diferencia entre los lotes fue que cada lote correspondía a síntesis distinta de oligonucleótidos.

### 2.2.2 Control de calidad determinados para PCR Master Mix (PMM) y sus materias intermedias

#### A. Material intermedio involucrado en la fabricación de la PMM

---

##### A.1 QIAGEN 10x PCR Buffer

---

El parámetro a evaluar fue la conductividad. Se recopilaron los valores de conductividad de 12 lotes distintos medidos por dos operadores en dos conductímetros. Y los rangos se establecieron de igual forma que como se hizo para la PCRMM.

##### A.2 DNTPS Y BIOTIN-11-DCTP

---

El control de calidad para los dNTPs y Biotin-11-dCTP fue las medidas obtenidas con el pHmetro (pH GLP 21 (Crison) y las medidas de concentración obtenidas mediante un espectrofotómetro (NanoDrop™ 8000 Spectrophotometer - Thermo Fisher Scientific).

###### A.2.1 pH

El proveedor de Biotin-11-dCTP (Jena Bioscience) nos informó que su rango de aceptación en la medida de pH era 7.0 – 8.5 y para los dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)  $8.5 \pm 0.1$ . En el caso de los dNTPs este valor se tuvo que determinar de nuevo porque el proveedor nos advirtió que este valor lo obtenía a 4°C y las medidas realizadas fueron a temperatura ambiente y, por tanto, había que incluir una corrección al valor esperado.

Se realizaron medidas de dos lotes distintos de materia prima, en dos equipos y por dos operadores para determinar si el rango se cumplía en el caso del Biotin-11-dCTP y en el caso de los dNTPs se calculó la diferencia que existía al medir a temperatura ambiente y el rango establecido se verificó con un lote de cada uno de los dNTPs.

###### A.2.2 Concentración

Al igual que con el pH, los valores de concentración determinados por el proveedor se tuvieron que verificar. En el caso de los dNTPs (dTTP, dATP, dCTP y dGTP) la concentración esperada es 100-110 mM y en el Biotin-11-dCTP de  $1 \pm 0.1$  mM.

Las concentraciones se midieron con un espectrofotómetro (NanoDrop™ 8000 Spectrophotometer - Thermo Fisher Scientific) seleccionando la longitud de onda correspondiente a cada uno de los dNTPs (dATP: 259 nm; dGTP: 253 nm; dTTP: 267 nm; dCTP: 271 nm) y para el Biotin-11-dCTP (294 nm) definida en el certificado analítico.

## Material y Métodos

Lo primero que se calculó fue la variabilidad de la medición de las diferentes longitudes de onda y a partir de esos valores se determinó una variabilidad global de la medición para el NanoDrop™ 8000 aplicable a cualquier medida realizada a los nucleótidos.

En el caso de los dNTPs, sus valores de concentración estaban fuera de los límites de cuantificación del espectrómetro (límite superior 3700 ng/mL), por eso se realizó una dilución previa (1:200) siendo la concentración esperada de 500 – 550  $\mu\text{M}$  para cada uno de los dNTPs. A esta concentración esperada se le aplicó la variabilidad global y así se determinó el rango de control de calidad.

Esta dilución se tuvo que poner a punto valorando aspectos que afectan a la precisión en las mediciones, es decir, se valoró la repetitividad y la reproducibilidad.

La repetitividad es la variación causada por el dispositivo de medición, es decir, la variación observada cuando el mismo operador realiza varias medidas, usando el mismo sistema de medición en las mismas condiciones. En cambio, la reproducibilidad es la variación causada por el sistema de medición, es decir, la variación observada entre diferentes operadores realizando distintas medidas en las mismas condiciones y en el mismo sistema de medición (Paisan *et al.*, 2010).

Los nucleótidos no modificados de Jena tienen una concentración de 100-110 mM. Después de una dilución 1/200, la concentración esperada está entre 500 y 550  $\mu\text{M}$  que se expandió a 460-590  $\mu\text{M}$  al tomar en cuenta la variabilidad de la medición de Nanodrop 8000 (los valores se redondearon al "0" o "5" más cercano).

Para la biotina-11-dCTP (de Jena), no se necesitó una dilución previa de 1/200 anterior, ya que tiene una concentración de  $1 \pm 0.1$  mM (o 1000 - 11000  $\mu\text{M}$ ). Teniendo en cuenta la variabilidad de la medición de Nanodrop 8000, y después de redondear los valores, se estableció una especificación de concentración final de 860-1140  $\mu\text{M}$  para este nucleótido.

### B. PCR Master Mix (PMM)

---

Definidos todos los controles de calidad de las materias intermedias involucradas en la fabricación de la PMM, a continuación, la conductividad fue el parámetro elegido como control de calidad de este componente del test.

La medida de conductividad expresa la cantidad de sales disueltas presentes en un líquido y es inversamente proporcional a la resistividad del mismo. La medida de la conductividad se obtiene aplicando un voltaje entre dos electrodos y midiendo la resistencia de la solución. (Gómez *et al.*, 2009). En el caso de medidas en soluciones acuosas, el valor de la conductividad es

## Material y Métodos

directamente proporcional a la concentración de sólidos disueltos, por lo tanto, cuanto mayor sea dicha concentración, mayor será la conductividad. Como tal, se puede usar por lo tanto como control de calidad de la PMM como solución homogénea que es.

La conductividad se midió mediante dos conductímetros EC-Metro EC-Metro GLP 31(Crison). Se recopilaron los valores de conductividad obtenidos de la fabricación de 24 PMM distintas y analizadas en dos conductímetros.

Dos factores que influyen en la medida son: la agitación de la solución cuando se está realizando la medida, ya que la corriente eléctrica se debe al movimiento de iones en la disolución y la temperatura, que influye en dicho movimiento, por lo que la medida se debía de realizar a 20 - 25 °C.

Se estableció el rango de aceptación, eliminando los valores atípicos o “outliers” del grupo de datos. Para ello, se utilizó el parámetro denominado desviación absoluta mediana (DAM) porque es una medida de dispersión estadística. Es un estadístico robusto, siendo mas resiliente a valores muy desviados del promedio en un conjunto de datos que la desviación estándar. Se calculó mediante la fórmula  $DAM = \text{mediana } \{|X_i - Me|\}$ , para  $i=1$  hasta  $n$ . Donde DAM es la mediana de los valores absolutos de los residuales (desviaciones) respecto a la mediana de los datos. Para utilizar DAM como un estimador consistente se multiplica por una constante que depende de la distribución y en este caso para distribuciones normales  $DAM_{xi} = 1.4826$ . Así, el valor atípico fue definido como el valor 4 veces o más desviado de DAM. Este valor se calculó con el programa estadístico JMP v12.0.

Una vez obtenidos, el rango quedó definido mediante los valores de conductividad más bajos y más altos obtenidos, ampliados en 5%, porcentaje de diferencia observado entre las medidas en los dos conductímetros EC-Metro EC-Metro GLP 31(Crison).

Así, como control de calidad del PMM también se tuvo en cuenta los componentes que componían dicho reactivo y la medida de conductividad, pH y concentración fueron los parámetros a evaluar en el material intermedio involucrado en su fabricación.

A través de la medida del pH se conoce el grado de acidez o basicidad de soluciones acuosas diluidas. Es en realidad una medida de la actividad de los iones hidrógeno en una solución electrolítica. Utilizarlo como control de calidad sirve para detectar posibles variaciones del rango habitual o de referencia.

Y la concentración se conoce la proporción que hay entre la cantidad de soluto y la cantidad de disolución o disolvente. De igual manera que con el pH se utilizó como control de calidad para detectar variaciones de concentración del rango habitual.

2.2.2 Control de calidad determinados para Bead Master Mix (BMM) y sus materias intermedias.

### A. Material intermedio involucrado en la fabricación de la BMM

---

#### A.1 Buffer de hibridación

---

Como control de calidad, el parámetro a evaluar en este caso fue la conductividad. En primer lugar, se midieron unos patrones de conductividad conocida y, a continuación, se midieron las muestras problema. En total, se recopilaron los valores de conductividad de 12 lotes distintos medidos por dos operadores en dos conductímetros para establecer un rango como criterio de aceptación.

Las mediciones de conductividad se realizaron utilizando 25 ml del buffer en un tubo Falcon de 50 mL y antes de medir se mezcló la solución invirtiendo el tubo 5 veces.

Por otra parte, también se realizó un estudio de estabilidad real de 3 lotes distintos del reactivo almacenado a temperatura ambiente en matraces de Erlenmeyer libres de ADNAsas. La conductividad fue medida a distintos tiempos (3, 6, 9, 13 meses) y finalmente se determinó la caducidad del reactivo.

Al igual que en otras ocasiones se recopilaron los datos de las distintas medidas de conductividad y se estableció el rango de aceptación, eliminando los valores atípicos o “outliers” del grupo de datos. Para ello, se utilizó el parámetro denominado desviación absoluta mediana (DAM) porque es una medida de dispersión estadística. Es un estadístico robusto, siendo más resiliente a valores muy desviados del promedio en un conjunto de datos que la desviación estándar. Se calculó mediante la fórmula  $DAM = \text{mediana } \{|X_i - Me|\}$ , para  $i=1$  hasta  $n$ . Donde DAM es la mediana de los valores absolutos de los residuales (desviaciones) respecto a la mediana de los datos. Para utilizar DAM como un estimador consistente se multiplica por una constante que depende de la distribución y en este caso para distribuciones normales  $DAM_{xi} = 1.4826$ . Así, el valor atípico fue definido como el valor 4 veces o más desviado de DAM. Este valor se calculó con el programa estadístico JMP v12.0.

Para establecer el rango de aceptación de conductividad, se consideraron los valores de conductividad más bajos y más altos obtenidos después de eliminar los valores atípicos y se amplió el rango un 5% debido a las diferencias entre los diferentes conductímetros.

### A.2 Conjugados o couplings

El proceso de conjugación es aquel mediante el cual que el grupo amino de la sonda se acopla al grupo carboxilo de la bead.

Se establecieron dos controles de calidad de este proceso. El primero consistió en valorar que el proceso de conjugación se había realizado correctamente, y con el segundo criterio, se determinó el rendimiento del proceso de conjugación, es decir, conociendo la cantidad de partida en el número de beads determinar la cantidad de beads recuperadas al final del proceso.

El primer criterio se determinó mediante la hibridación y posterior marcaje con SAPE de los conjugados con sus antisondas correspondiente, es decir, las secuencias reversas complementarias con el extremo 5' modificado con biotina.

**Tabla 11. Ejemplo que muestra la secuencia de una sonda con su extremo 5' tiene un grupo amino primario modificado al final de un espaciador e 6 carbonos (5AmMC6) y su correspondiente antisonda con su extremo 5' biotina modificado (5Biosg).**

	<u>Secuencia</u>
Sonda	/5AmMC6/GAGGCTAGGTGGGGGCGAG
Antisonda	/5Biosg/CTCGCCCCACCTAGCCTC

Se tuvo que optimizar la concentración de trabajo, y para ello, a partir de la concentración stock 100  $\mu$ M de la antisonda se realizaron diluciones seriadas hasta conseguir la concentración cuya señal fuera al menos un valor de MFI 10000. Este valor es la señal en saturación que al menos se debía obtener cuando si el rendimiento en el proceso de la conjugación ha sido óptimo (Angeloni *et al.*, 2018).

Se analizaron las dos concentraciones 1  $\mu$ M y 100 nM que se testaron con conjugados fabricados con un (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride) (EDC) control y con un EDC que denominamos "malo" porque se sometió a humedad extrema para que se hidratara y afectara al proceso.

Y con el segundo criterio, se calculó el número de beads recuperadas al final del proceso de conjugación mediante el Multisizer 3 Coulter counter (Beckman Coulter). El conteo de cada uno de las partículas (beads), estén o no conjugadas, debían de ser al menos un 50% de la cantidad de beads iniciales. Un conjugado con un menor número de microesferas produciría una BMM con una bead limitante, es decir, cuando la BMM sea detecta en el Luminex el resultado emitido sería erróneo.

### A.3 SONDAS

---

Al igual que los primers se cuantificaron con el espectrofotómetro (NanoDrop™ 8000 Spectrophotometer - Thermo Fisher Scientific) para confirmar que cumplían los mismos criterios, en cuanto a su concentración, que los establecidos para los primers.

### A.4 BUFFER MES

---

El buffer MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) se utiliza durante el proceso de conjugación. Este buffer es esencial para la eficiencia del proceso de acoplamiento sonda-bead mediante el EDC. El control de calidad que se estableció para este buffer fue la medida de conductividad. Para ello, se midieron unos patrones de conductividad conocida y, a continuación, se midió la conductividad del buffer MES. Al igual que para otros reactivos el rango establecido se determinó con las medidas realizadas y el porcentaje de diferencia entre equipos. A su vez la fabricación de los conjugados se realizó en dos tandas según el protocolo de fabricación, y se estableció que entre tanda y tanda se debía medir adicionalmente, como un segundo control de calidad, el pH del buffer (MES), ya que es un punto crítico de la fabricación debido a que el pH afecta a la eficiencia de la reacción de acoplamiento sonda-bead mediante el EDC (xMAP® Luminex®, 2018).

También se realizó un estudio de estabilidad real durante 1 mes de 10 lotes distintos del reactivo almacenado a temperatura ambiente en matraces de Erlenmeyer libres de ADNAsas.

### A.5 EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride)

---

El EDC es un reactivo higroscópico que se hidrata afectando a la eficiencia de la conjugación. Un parámetro de control de calidad que indica la presencia o no de humedad en el reactivo es medir el punto de fusión con un MPA 100 - OptiMelt (Stanford Research Systems). Por ello establecimos como control de calidad el valor llamado onset point, es decir, la temperatura a la que el EDC comienza a cambiar de estado sólido a líquido.

La  $T_m$  (Melting temperature) o temperatura de fusión del EDC está estimada en torno a los 112°C, si el reactivo estuviese hidratado este valor se alteraría.

Además, también se definió la llamada velocidad de rampa, es decir, el aumento de temperatura por segundo que fue 1 ° C / minuto. Se partió de una temperatura inicial de 105°C (7° C por debajo de la temperatura de fusión estimada del EDC (112 °C) y se finalizó en 116°C (4° C por encima de la temperatura de fusión estimada del EDC (112 °C). Se partió de la premisa que el alejamiento del punto de fusión debería ser  $\leq$  a 2 ° C para considerar los resultados como aceptables. Los rangos de punto de fusión es también llamado Melting point ranges (MP) = clear

## Material y Métodos

point – onset point, es decir, MP = punto de fusión – punto de inicio (donde empieza a cambiar de estado sólido a líquido). Los puntos de inicio debían estar alrededor de 108 ° C, mientras que el punto de fusión se esperaba alrededor de 112 ° C.

Además, también se definió el coeficiente de variación, medido en %, admisible entre los tres capilares, es decir, como se muestra en la Figura 28 cuando se realiza la medida se introducen 3 capilares independientes que contienen el EDC y se obtiene la medida de cada capilar. Se realizaron diversas medidas en días, lotes y operadores distintos para diferenciar lo que era variabilidad de lo que era error en la medida.

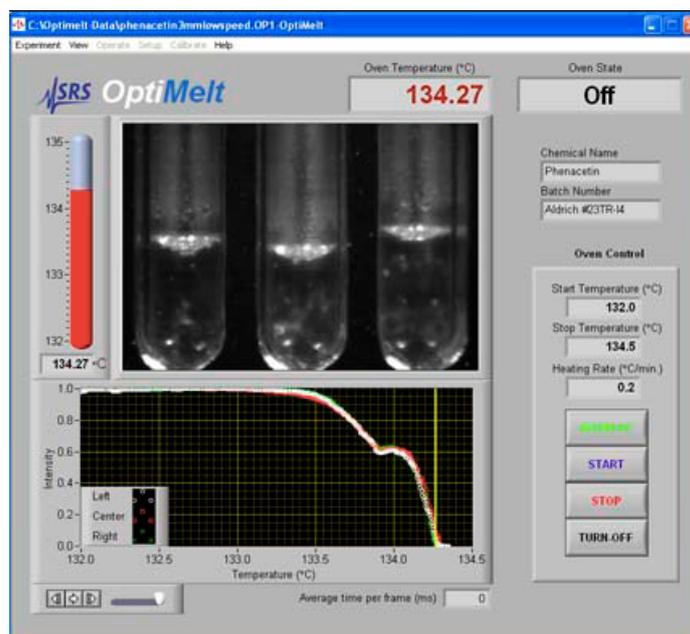


Figura 28. Imagen que muestra los tres capilares que se miden en el MPA 100 - OptiMelt (Stanford Research Systems). Cada capilar está lleno del EDC al cual se somete a las condiciones de temperaturas programadas de inicio y de finalización. Los resultados mostraron el onset point.

Se analizaron los resultados con la prueba t de Student, para ver las posibles diferencias significativas entre días y operadores.

### B. Bead Master Mix (BMM)

Definidos todos los controles de calidad de las materias intermedias involucradas en la fabricación de la BMM, se definió qué control de calidad era el más adecuado para este componente.

El control de calidad establecido consistió en contar el número de conjugados presentes en la BMM. Se realizó mediante un Multisizer 3 Coulter counter (Beckman Coulter), es decir, un contador de partículas. Este aparato se basa en el principio Coulter que dice el aumento

## Material y Métodos

transitorio en la impedancia (resistencia al paso de una corriente eléctrica) a través del canal por el que circula una corriente eléctrica es proporcional al volumen ocupado en cada instante de tiempo por la partícula que lo atraviesa (Beckman Coulter, 2009). Este instrumento mide partículas de un tamaño 0.4 - 1200  $\mu\text{m}$  de diámetro y como las beads que conforman los conjugados tiene un tamaño de 5.6  $\mu\text{m}$  su utilización es compatible con nuestros objetivos.

Para establecer el rango que definiría la concentración de beads en la BMM se calculó de forma teórica teniendo en cuenta las especificaciones del certificado analítico de las beads de Luminex y un valor de coeficiente de variación (CV %) establecido según las distintas medidas realizadas. Definido CV (%) permitido, se interpretó que un CV mayor del definido era un error de procesamiento en la preparación de las muestras a cuantificar.

---

### 2.2.3 Control de calidad para el estreptavidina-ficoeritrina (SAPE)

#### A. SAPE

---

Al utilizar distintos SAPE de varios proveedores se observó en la fase 1: Diseño y optimización del test de genotipado sanguíneo (ID RHD XT) que en algunos había presencia de precipitados que interferían con el recuento que hacía luminex de sus beads, es decir, se generaban recuentos incorrectos por la presencia de estas partículas. El control de calidad consistió en detectar y descartar estos SAPEs. Por lo tanto, para el SAPE, el control de calidad establecido fue detectar la presencia de partículas mediante el Multisizer 3 Coulter counter (Beckman Coulter).

---

### 2.2.4 Control de calidad para el SAPE DILUTION BUFFER

Para el SAPE dilution Buffer, el parámetro a evaluar fue la conductividad ya que es un parámetro fiable para medir el contenido iónico en una solución.

Se recopilaron los valores de conductividad de 5 lotes distintos medidos por dos operadores en dos conductímetros para establecer el rango aceptado.

Al igual que en otras ocasiones se recopilaron los datos de las distintas medidas de conductividad y se estableció el rango de aceptación, eliminando los valores atípicos o "outliers" del grupo de datos. Para ello, se utilizó el parámetro denominado desviación absoluta mediana (DAM) porque es una medida de dispersión estadística. Es un estadístico robusto, siendo más resiliente a valores muy desviados del promedio en un conjunto de datos que la desviación estándar. Se calculó mediante la fórmula  $DAM = \text{mediana } \{|X_i - M_e|\}$ , para  $i=1$  hasta  $n$ . Donde DAM es la mediana de los valores absolutos de los residuales (desviaciones) respecto a la mediana de los datos. Para utilizar DAM como un estimador consistente se multiplica por una constante que

## Material y Métodos

depende de la distribución y en este caso para distribuciones normales  $DAM_{xi} = 1.4826$ . Así, el valor atípico fue definido como el valor 4 veces o más desviado de DAM. Este valor se calculó con el programa estadístico JMP v12.0.

Para establecer el rango de aceptación de conductividad, se consideraron los valores de conductividad más bajos y más altos obtenidos, después de eliminar los valores atípicos, y se amplió el rango un 5% para incluir las diferencias entre los diferentes conductímetros.

También se realizó un estudio de estabilidad real durante 25 meses a 2-8°C de 3 lotes distintos en los matraces Erlenmeyer libres de ADNAsas.

### Fase 3: Validación del test

Esta fase se llevó a cabo mediante la realización de distintos estudios necesarios para obtener la aprobación de marcado CE, requisito de conformidad legal obligatorio para todos los productos que se comercialicen en la Unión Europea (UE). Para su obtención, el organismo notificado autorizado de la Unión Europea. TÜV-SÜD, evaluó la conformidad del producto o test dentro de los requisitos de la mayoría de las Directivas y Reglamentos de la UE.

Para ello los estudios se realizaron siguiendo las distintas guías del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) que promueve el desarrollo y el uso de normas y pautas de consenso voluntario de laboratorio dentro de la comunidad de atención médica (<https://clsi.org/>).

En todos los estudios se utilizaron lotes de distintos reactivos de los 4 componentes de ID RHD XT (PMM, BMM, SAPE y SAPE DILUTION BUFFER) previamente liberados por el departamento QC.

Además, en todos los estudios que se realizaron para la validación del test se utilizó un panel de 4 muestras (NA19327 (RH1), HG01894 (RH2), NA19904 (RH3) y NA20294 (RH4), líneas celulares del *National Human Genome Research Institute* (NHGRI) para la investigación genética humana adquiridas del Coriell Institute for Medical Research (New Jersey, EE. UU). Junto al panel de muestras también se incluyeron en cada experimento dos muestras positivas como control de procesamiento ID RHD CONTROL 1 y ID RHD CONTROL 2 y un control negativo (agua).

Este panel cubría todos los genotipos y fenotipos predichos con frecuencias superiores al 1%, con la excepción del resultado del fenotipo "Weak D Type 1 o D+", es decir, que expresan un número menor de sitios antigénicos por eritrocito comparado con un fenotipo D positivo normal, fue reemplazado por "Weak D Type 1" (el más frecuente clínicamente relevante "Weak D Type"). El panel de ADN fue previamente caracterizado mediante secuenciación bidireccional Sanger.

Este método se conoce como método dideoxi o secuenciación por terminación de cadena. Es un método enzimático que permite sintetizar, de forma secuencial, una hebra de ADN complementaria a una hebra de cadena simple (que se utiliza como molde), en presencia de ADN polimerasa, los cuatro 2'-deoxinucleótidos que componen la secuencia del ADN (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) y cuatro dideoxinucleótidos (ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP). Estos últimos nucleótidos "especiales" o nucleótidos de parada, están diseñados para que carezcan del grupo 3'-OH, que permite la adición del nucleótido consecutivo, de forma que cuando uno de ellos es incorporado por la polimerasa se interrumpe la síntesis de la nueva hebra. Esto lleva a que se obtengan fragmentos secuenciados de diferente tamaño, según dónde se incorporen los

## Material y Métodos

dideoxinucleótidos. De este modo, y tras una simple electroforesis, las bandas se traducen en los diferentes nucleótidos y se deduce la secuencia (Munshi, 2012).

## Material y Métodos

Tabla 12. Genotipos del panel de muestra.

Sistema grupo sanguíneo	Nombre de las muestras (ID)			
	NA19327	HG01894	NA19904	NA20294
Rh	<i>RHD deletion</i>	<i>RHD*weak D type 1</i>	<i>RHD*Pseudogene heterozygous</i>	<i>RHD*DIIIa-CE(3-7)-D heterozygous</i>
HPA-1	HPA1a/1a	HPA1a/1b	HPA1a/1a	HPA1b/1b

Tabla 13. Fenotipos predichos del panel de muestras.

Antígeno	Nombre de las muestras (ID)			
	NA19327	HG01894	NA19904	NA20294
D (RH1)	D-	Weak D Type 1	Weak D Types 1, 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1, 2 or 3 not detected (*)
HPA-1a	+	+	+	0
HPA-1b	0	+	0	+

(\*) *RHD* gene present. D- (*RHD\*DIIIa-CE(3-7)-D* or *RHD\*Pseudogene* genotype not detected)

## Material y Métodos

Se determinaron unos criterios de aceptación mínimos que tuvieron que cumplir todos los estudios, excepto en aquellos que tenían sus propios criterios y que se detallan en su correspondiente apartado.

El resultado de antígeno correcto (*"antigen call rate"*) debía ser mayor o igual al 95% y el resultado por antígeno mayor o igual 99% de los resultados esperados. Se analizó el panel de muestras y sus correspondientes réplicas en cada uno de los estudios y se determinó los fenotipos predichos confirmándose la aceptación o no de los criterios.

---

### 3.1 Estudio estabilidad real

Este estudio consistió en determinar la caducidad del kit almacenado a 2-8°C. Los tiempos evaluados fueron: 0, 3, 6, 9, 10, 12, 13, 15 y 16 meses. La elección de estos tiempos fue porque previamente se realizó un estudio de estabilidad acelerado a 25°C ± 2°C con el que se determinó la estabilidad del test en 16 meses.

El estudio de estabilidad también implicó evaluar la estabilidad o el impacto que podría conllevar la temperatura de almacenamiento (2-8°C) sobre el resto de componentes que conforman el kit (el CD que contiene el software de análisis, las etiquetas de los tubos y la caja en si misma).

En el caso de la caja y las etiquetas se verificó que no estaban deterioradas. Además, en la tapa de la caja, donde está la información en formato código de barras, se confirmó su estado escaneándolos con el lector de código de barras.

El diseño del estudio se realizó siguiendo la guía "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI) EP25-A (Evaluación de la estabilidad de los reactivos de diagnóstico *in vitro*), y se analizaron tres lotes diferentes de ID RHD XT (lote 2, 3 y 5).

En cada punto temporal se analizaron 20 réplicas del panel de muestras de ADN genómico. El estudio fue realizado por dos operadores y 3 lotes diferentes de enzima, uno con cada lote de ID RHD XT. Para cada tiempo se asignó un número de kit concreto (Tabla 14), este número de kit fue calculado de forma aleatoria del total fabricados. Cada caja que contenía los reactivos que conformaban el kit fue montado en el orden de alicuotado de cada reactivo, es decir, la alícuota número 1 de los componentes del kit (PCRMM, BMM, SAPE y SAPE DILUTION) correspondía al kit 1 de cada lote hasta llegar a la última alícuota cuyo número dependía del tamaño del lote.

---

### 3.2 Estudio del vial abierto (*Open Vial*)

Este estudio evaluó la estabilidad del "vial abierto" (es decir, del vial en uso) de los reactivos del kit ID RHD XT (PCRMM, Bead Master Mix, SAPE dilution buffer y SAPE) almacenados a 2-8 °C.

## Material y Métodos

Después de 6 meses de almacenamiento a 2-8°C, los kits se abrieron y testaron cada tres meses durante un período de 6 meses (T6 = primera apertura. T9 = mes 3 después de la apertura y T12 = mes 6 después de la apertura) (Figura 29).

Además, se evaluarán dos puntos de tiempo adicionales (T13 y T16) a los 7 y 10 meses después de la apertura. Estos dos puntos se realizaron porque los resultados previos del estudio de estabilidad acelerado 25°C ± 2°C determinó la estabilidad del test en 16 meses, por lo tanto, hubo que confirmar que un vial abierto durante ese periodo era estable.

Por lo tanto, el estudio evaluó 15 meses de almacenamiento (6 meses kits cerrados + 9 meses en uso = 15 meses).

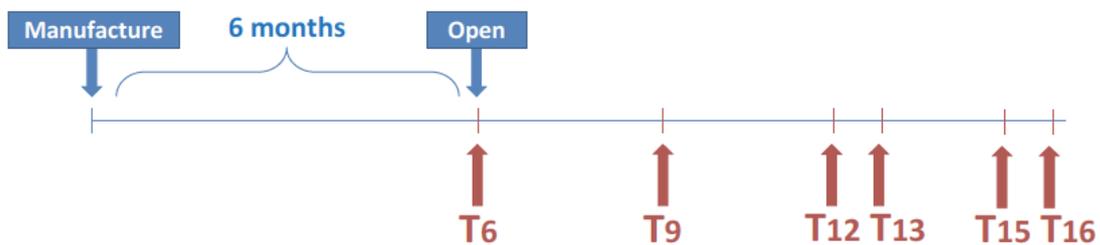


Figura 29. Esquema que muestra la cronología del estudio.

Otro punto a evaluar fue el impacto en la estabilidad que podría sufrir la *Bead Master Mix* al tener el reactivo a temperatura ambiente durante el tiempo de su dispensación en cada punto del estudio. Para ello se estableció un tiempo de 30 minutos desde que se extraía el reactivo del refrigerador (2-8°C) hasta su devolución a la misma temperatura. Este tiempo se determinó con el valor medio obtenido entre distintos operadores que tardaron en dispensar una placa de 96 pocillos con una pipeta monocal.

Durante todo el estudio se utilizaron los mismos lotes de reactivos, es decir, el mismo lote de enzima polimerasa como el mismo lote de cada uno de los componentes que conforman el test.

## Material y Métodos

Tabla 14. Tabla con el número de kit analizado en cada tiempo en los 3 lotes de ID RHD XT distintos.

Número de kit analizado en cada tiempo			
Tiempo (meses)	Lote de ID RHD XT		
	3201020002	3201020003	3201020005
3	48	8	121
	24	4	60
	128	16	12
	37	60	81
6	45	115	101
	68	95	136
	25	68	58
	18	32	5
9	97	80	35
	61	66	95
	138	99	117
	92	11	94
10	102	98	74
	19	64	102
	52	87	108
	82	145	110

## Material y Métodos

---

	67	17	124
	4	15	65
12	124	143	59
	99	135	34
<hr/>			
	136	134	21
	31	136	29
13	94	40	109
	107	26	125
<hr/>			
	144	36	83
	143	92	78
15	137	3	75
	122	50	40
<hr/>			
	71	124	42
	110	23	120
16	36	5	53
	87	122	41
<hr/>			
	33	77	17
Extra para repeticiones	22	137	100

## Material y Métodos

78	125	38
34	96	62
76	53	14
103	43	43
66	65	16

### 3.3 Estudio de detección del límite inferior

Este estudio evaluó el límite de detección inferior (LoD) para el test ID RHD XT utilizando el modelo *probit* según lo establecido en el estándar “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) EP17-A2. El modelo *probit* es un tipo de regresión donde la variable dependiente puede tomar solo dos valores.

Las cuatro muestras de ADN genómico (*Panel de Muestras*) se prepararon a las concentraciones requeridas (10, 5, 2, 1, 0.1 y 0.05 ng /  $\mu$ l) a partir de alícuotas de 20 ng /  $\mu$ l previamente preparadas (ver Tabla 15).

**Tabla 15. Cálculo de las diluciones necesarias para testar las concentraciones óptimas para determinar el límite de detección inferior (LoD).**

DNA input (ng)	Concentracion stock (ng/ $\mu$ L)	Vol. de ADN stock ( $\mu$ L)	Vol. de TE 0.5mM ( $\mu$ L)	Volumen final ( $\mu$ L)	Concentracion final (ng/ $\mu$ L)
100	NA	NA	NA	NA	20
50	20	125	125	250	10
25	10	125	125	250	5
10	10	50	200	250	2
5	2	125	125	250	1
0.5	10	3	297	300	0.1
0.25	10	2	398	400	0.05

NA (No aplica)

Se utilizaron un total de dos lotes de reactivos diferentes tanto de ID RHD XT (lotes: 3201000002 y 3201000003), como de enzimas (lotes: 151049713 y 1540109153), un mismo termociclador. Luminex® y operador. Además, el estudio debía ejecutarse en, al menos, 3 días distintos.

## Material y Métodos

Se analizaron los resultados en cada nivel de concentración de ADN y se determinó el "call rate" o el porcentaje de resultados correctos, en cada nivel y lote de reactivos. Los "call rates" se convirtieron matemáticamente en unidades de probabilidad normal acumulativa ajustándolas a un modelo probit, es decir, un tipo de regresión para las variables de resultados binarios. Se ajustó la regresión frente a la concentración de ADN para calcular la tasa de aciertos de 0.95 que determinó el límite de detección (LoD) de cada lote de reactivos.

La concentración a la que se obtuvo el 95% de resultados correctos se estableció como el límite de detección (LoD) del lote analizado el valor más alto obtenido determinó el LoD del test. El software utilizado para el análisis fue JMP v12.0.

El diseño de este estudio y su análisis cumplía con los requisitos establecidos por la guía EP17-A2 de "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI).

### 3.4 Estudio de detección del límite superior

Las concentraciones de ADN analizadas para determinar el LoD superior se escogieron en función de las concentraciones de ADN genómico obtenidas habitualmente de la extracción de sangre total y en las que el resultado posterior con ID RHD XT fuese 100% correcto.

Cuarenta (40) observaciones replicadas para cada muestra se analizaron en cada nivel de concentración de ADN (20 por lote) (Tabla 16).

Tabla 16. Concentración de ADN testada para determinar el LoD superior.

Nivel	ADN	
	Input (ng)	Conc (ng/μL)
1	1000	200
2	750	150

El estudio fue realizado por un operador utilizándose dos lotes de reactivos de ID RHD XT (3201000003 y 3201000004) y dos lotes de enzima polimerasa (154010915 y 151039708). El mismo termociclador y el mismo equipo Luminex fueron utilizados a lo largo del estudio.

Se analizaron los resultados al igual que el estudio anterior y se determinó el LoD superior con el valor menor obtenido de los 2 lotes de reactivos y que cumpliera los criterios de aceptación.

---

### 3.5 Estudio de verificación de termocicladores

Se evaluaron 3 modelos diferentes de termocicladores; 1.- *Geneamp® PCR System 9700 (Life Technologies)*, bloque aluminio. 2.- *Veriti® Dx (Life Technologies)* y 3.- *Geneamp® PCR System 9700 (Life Technologies)* bloque “gold”.

El estudio se llevó a cabo con un operador y con un lote de reactivo de ID RHD XT 3201000001 y de enzima 151039708. Se analizó el panel de muestras con 3 réplicas por muestra para cada uno de los termocicladores.

Los criterios de aceptación para el estudio fueron definidos como *Antigen call rate*  $\geq 95\%$  y *correct calls*  $\geq 99\%$ .

---

### 3.6 Sustancias interferentes

El impacto de las posibles sustancias interferentes, sustancias endógenas y exógenas en el contexto de las necesidades médicas, fue evaluado mediante el análisis de tres muestras de sangre total anticoagulada con EDTA-K2 (Tabla 17). Estas sangres fueron recopiladas de manera aleatoria de donantes voluntarios anónimos a través de *Bioreclamation IVT (New York, USA)*.

El diseño del estudio se realizó siguiendo las recomendaciones de la guía “Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) EP7-A2” (Pruebas de interferencia en química clínica).

Estas tres sangres, sin ningún interferente añadido, se analizaron mediante secuenciación Sanger y sus resultados fueron comparados con los obtenidos en ID RHD XT en las sangres con interferentes, añadidos antes de realizar su extracción de ADN.

Los criterios de aceptación fueron que los resultados con ambos métodos, tenían que ser iguales, además del resto de criterios ya descritos anteriormente para los estudios.

## Material y Métodos

Tabla 17. Sustancias interferentes y solventes testadas en el estudio.

Código interno	Sustancias interferentes y solventes
B	Bilirubina (no conjugada)
BS	Solución hidróxido de sodio (0.1 N NaOH)
H	Hemoglobina (hemolizado)
T	Lipoproteínas ricas en triglicéridos
A	Proteínas (Albumina)
AS	Aspirina (ácido acetilsalicílico)
E	Etanol (100%)
I	Ibuprofeno
ADN	Etanol (96%)
AM	Ampicilina
AC	Acetaminofeno
HP	Heparina
W	Warfarina
DH	Difenhidramina
AT	Atorvastatina
D	Dimetilsulfóxido (DMSO 0.2%)

Por lo tanto, por un lado, alícuotas de las muestras de sangre total se enriquecieron con las concentraciones adecuadas de sustancias interferentes para simular los estados de hemólisis, ictericia y lipemia ( $\geq 500$  mg/dL de hemoglobina,  $> 20$  mg/dL de bilirrubina y  $> 3000$  mg/dL de lipoproteína rica en triglicéridos, respectivamente) en muestras de sangre. Además, también se evaluó el efecto de la proteína total ( $>12$  g/dL con  $> 6$ g/dL de albúmina).

Por otro lado, como sustancias exógenas, y en función del uso previsto de ID RHD XT, se testaron: un antibiótico (ampicilina 152  $\mu\text{mol/L}$ ), un analgésico (paracetamol 1324  $\mu\text{mol/L}$ ), medicamentos antiinflamatorios (ibuprofeno 2425  $\mu\text{mol/L}$ ), anticoagulantes (warfarina 32.5  $\mu\text{mol/L}$ ; heparina 3000 U/L y aspirina 3.62 mmol/L), (la aspirina que a su vez también es un analgésico), un medicamento reductor del colesterol atorvastatina (600  $\mu\text{g/L}$ ) y un medicamento para la alergia difenhidramina (19.6  $\mu\text{mol/L}$ ).

Además del agua, se utilizaron como disolventes DMSO (para la atorvastatina y la warfarina), etanol (para la aspirina, el ibuprofeno y la warfarina) y NaOH (para la bilirrubina). Como tal, también se agregaron a la sangre para usarlos como controles.

Asimismo, el etanol (utilizado en el proceso de extracción de ADN) también se evaluó como un potencial contaminante, por lo que se enriqueció con etanol al 5% la muestra de ADN genómico extraído en vez de la muestra original de sangre total.

## Material y Métodos

Por lo tanto, se probaron un total de 16 condiciones con interferentes y dos condiciones sin interferente (i.e., condición control). En total se analizaron 162 réplicas en el transcurso del estudio (3 muestras, 18 condiciones (16 con interferentes y 2 sin interferente), ADN extraído por triplicado:  $3 \times 18 \times 3 = 162$ ). Las extracciones de ADN de las muestras con interferentes y sin interferentes, fueron realizadas mediante dos lotes del QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen). Cada extracción se realizó por triplicado para cada condición. Las muestras de sangre total utilizadas fueron almacenadas a 2-8°C durante 6 semanas.

El estudio fue realizado por dos operadores con un lote de enzima (151039708) y un lote de ID RHD XT (3201020001).

---

### 3.7 Estudio de precisión intermedia

La precisión representa la capacidad del método de medida de dar el mismo resultado en mediciones repetidas del mismo objeto llevadas a cabo en las mismas condiciones. En este estudio se siguió la guía CLSI EP12-A2 (Evaluación del rendimiento de la prueba cualitativa) para su diseño.

El estudio fue realizado por 2 operadores. Cada operador realizó cada experimento al día, alternando los equipos (pipeta, termocicladores, Luminex, etc) en 6 días no consecutivos, durante un período de al menos 20 días. Cada día de experimento se analizaba el panel de muestras por triplicado con 3 lotes de reactivos (3 lotes de enzima polimerasa y 3 lotes de reactivos de ID RHD XT). El total de muestras del panel procesadas en el estudio fue 432, ya que cada día se procesaban 72 muestras (36 muestras por operador). Además, cada día también se procesaban los controles de procesamiento, ID RHD CONTROL y el Negative Control, por lo que el total de controles al día era de 18 (9 controles por operador).

La tabla 18, es un ejemplo de diseño de placa realizado cada día del estudio.



## Material y Métodos

Los primeros dos días, se usó el Panel de Muestras (ver arriba) a una concentración de ADN de 2 ng/μl (el límite inferior de detección con un 100% de "correct calls") y los dos siguientes días, el panel de muestras a 200 ng/μl (el límite superior de detección testado) y los dos últimos se analizó el Panel de Muestras a 20 ng/μl (concentración de referencia).

Por lo tanto, todas las variables (operador, instrumento y lote de reactivos) se analizaron cada "día" con la excepción de la "concentración de ADN" en el que cada día se analizaba una concentración determinada.

Para cada operador, instrumento, día, lote de reactivos y concentración de ADN, se analizaron los resultados y se confirmó que los fenotipos predichos para todas las muestras de ADN genómico y sus réplicas fuesen los esperados.

Se determinó como un impacto en la precisión del test si más del 5% del total de las muestras del panel, presentaban un resultado "No call" y/o más del 1% un resultado fenotipo predicho incorrecto. Es decir, se requiere para dar por válido el test que el *Antigen call rate*  $\geq 95\%$  y *"Correct call"*  $\geq 99\%$ .

Además, para evaluar la variabilidad debida al operador, instrumento, día y lote de reactivos en los resultados del test, desde un punto de vista cuantitativo, se realizó un análisis de los componentes de la varianza con los ratios de fluorescencia obtenidos durante el estudio tanto para los ratios de ausencia / presencia como para los ratios de los genotipos homocigoto frecuente (3), heterocigoto (2) y homocigoto infrecuente o mutante (1).

El modelo estadístico incluyó las siguientes variables:

"Ratio de fluorescencia" como variable dependiente.

"Operador". "Instrumento". "Día" y "Lote de reactivos" como variables independientes.

Todas las variables independientes fueron consideradas como variables de efectos aleatorios. Fueron enumerados en la declaración modelo en el siguiente orden; "Concentración de ADN" dentro de "Día" y "Día" unido "operador" e "Instrumento".

Este análisis de los resultados de los componentes de la varianza se calculó mediante el software JMP v12.

### 3.8 Estudio de tolerancia a la variabilidad en el protocolo (*Guard banding*)

Se define la tolerancia a la variabilidad en el protocolo como la capacidad de variación desde el límite de la especificidad hasta el límite de la zona de aceptación o rechazo, es decir, cuánto puede cambiar un parámetro para considerarlo válido o no. Por ejemplo, modular los tiempos de agitación de un reactivo y valorar su posible impacto en el resultado final del proceso.

Esta tolerancia a la variabilidad en el protocolo del ensayo de ID RHD XT se evaluó, desde la etapa de amplificación del ADN (PCR) hasta la adquisición de datos en el Luminex® (Amplificación, Hibridación, Marcaje y Adquisición de datos).

Cada uno de los pasos principales de procesamiento del test se analizó para determinar, a partir de un enfoque basado en el riesgo, cuáles eran los puntos críticos. Así, las condiciones testadas se dividieron en dos grupos; las llamadas “peores condiciones” y las “mejores condiciones”. Las “peores condiciones” englobaban cambios en los límites inferiores que hacían referencia a tiempos de mezcla, centrifugación y procesamiento y las “mejores condiciones” a cambios en los límites superiores. (Tabla 19, 20, 21 y 22). También se testaron variaciones de temperatura ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), tiempos, ciclos en la PCR y volúmenes ( $\pm 25\%$ ) tanto en la amplificación del ADN como en su hibridación (Tabla 19 y Tabla 20).

Se analizaron 3 réplicas de cada una de las muestras del panel con un lote de reactivos para cada uno de las condiciones llamadas “peores condiciones” y las “mejores condiciones”.

Para cada condición (“peores” y “mejores”), se confirmaron los fenotipos predichos en todas las replicas del panel de muestras fueran 100% correctos comparados con los obtenidos en las condiciones nominales.

**Tabla 19. Condiciones testadas (límite inferior, límite superior y congelación) correspondientes a cada uno de los pasos a seguir en el proceso de amplificación (PCR).**

Proceso	Paso del proceso	Método	Párametro	Testado	Condición
Preparación PCR Master Mix (PCRMM)	Mezclar PCRMM	Agitación a máxima velocidad	Tiempo	3 seg	Límite inferior
				5 seg	Límite superior
	Centrifugar tubos PCRMM	Centrifugación a mínima velocidad (400 g)	Tiempo	3 seg	Límite inferior
				5 seg	Límite superior

## Material y Métodos

Proceso	Paso del proceso	Método	Párametro	Testado	Condición
<b>Preparación ADN Polymerase</b>	Mezclar ADN polimerasa	Agitación a máxima velocidad	Tiempo	3 seg	Límite inferior
				5 seg	Límite superior
	Centrifugar tubos ADN polimerasa	Centrifugación a mínima velocidad (400 g)	Tiempo	3 seg	Límite inferior
				5 seg	Límite superior
<b>Preparación mix de Reacción de PCR</b>	Mezclar mix de reacción de PCR	Agitación a máxima velocidad	Tiempo	3 seg	Límite inferior
				5 seg	Límite superior
	Centrifugar tubos mix de reacción de PCR	Centrifugación a mínima velocidad (400 g)	Tiempo	3 seg	Límite inferior
				5 seg	Límite superior
	Mix de reacción de PCR, enzima (Taq) volumen	Pipeteo manual	Volumen	0.375 µl	Límite inferior
				0.625 µl	Límite superior
<b>ADN control y muestras a testar</b>	Mezclar tubos muestras ADN	Agitación a máxima velocidad	Tiempo	3 seg	Límite inferior
				5 seg	Límite superior
	Centrifugar tubos muestras ADN	Centrifugación a mínima velocidad (400 g)	Tiempo	3 seg	Límite inferior
				5 seg	Límite superior
<b>Preparación placa PCR</b>	Dispensar Mix de reacción de PCR y muestras ADN	Pipeteo manual	Tiempo	Dispensación inmediata	Límite inferior
				60 min	Límite superior
<b>Reacción PCR</b>	Centrifugar placa con mix de reacción de PCR	Centrifugación a mínima velocidad (400 g)	Tiempo	3 seg	Límite inferior
				5 seg	Límite superior

## Material y Métodos

Proceso	Paso del proceso	Método	Párametro	Testado	Condición
	Estabilidad producto PCR	Almacenamiento 4°C	Tiempo	Uso inmediato	Límite inferior
				96h	Límite superior
		Almacenamiento - 20°C	Tiempo y Temperatura	5 semanas	Condición congelada
	Activación Polimerasa	Programa de amplificación PCR	Temperatura	94°C	Límite inferior
				96°C	Límite superior
	Activación Polimerasa	Programa de amplificación PCR	Tiempo	13 min	Límite inferior
				17 min	Límite superior
	Ciclos PCR	Programa de amplificación PCR	C	35	Límite inferior
				45	Límite superior
	Temperatura desnaturalización	Programa de amplificación PCR	Temperatura	94°C	Límite inferior
				96°C	Límite superior
	Tiempo desnaturalización	Programa de amplificación PCR	Tiempo	26 seg	Límite inferior
				34 seg	Límite superior
	Temperatura anillamiento	Programa de amplificación PCR	Temperatura	59°C	Límite inferior
				61°C	Límite superior
	Tiempo anillamiento	Programa de amplificación PCR	Tiempo	26 seg	Límite inferior
				34 seg	Límite superior

## Material y Métodos

Proceso	Paso del proceso	Método	Párametro	Testado	Condición
	Temperatura extensión	Programa de amplificación PCR	Temperatura	71°C	Límite inferior
				73°C	Límite superior
	Tiempo extensión	Programa de amplificación PCR	Tiempo	70 seg	Límite inferior
				90 seg	Límite superior
	Temperatura final extensión	Programa de amplificación PCR	Temperatura	71°C	Límite inferior
				73°C	Límite superior
	Tiempo final extensión	Programa de amplificación PCR	Tiempo	6 min	Límite inferior
				8 min	Límite superior

Tabla 20. Condiciones testadas (límite inferior y límite superior) correspondientes a cada uno de los pasos a seguir en el proceso de hibridación.

Proceso	Paso del proceso	Método	Párametro	Testado	Condición
<b>Preparación placa hibridación</b>	Mezclar Bead Master Mix (BMM)	Agitación a máxima velocidad	Tiempo	10 seg	Límite inferior
				15 seg	Límite superior
	Centrifugar placa con producto PCR		Tiempo	3 seg	Límite inferior

## Material y Métodos

Proceso	Paso del proceso	Método	Párametro	Testado	Condición	
		Centrifugación a mínima velocidad (400 g)		5 seg	Límite superior	
	Dispensar BMM y añadir producto de la PCR	Pipeteo manual	Tiempo	Dispensación inmediata	Límite inferior	
				30 min	Límite superior	
	Dispensar BMM	Pipeteo manual	Volumen	34.5 µl	Límite inferior	
				57.5 µl	Límite superior	
	Añadir producto de la PCR	Pipeteo manual	Volumen	3 µl	Límite inferior	
				5 µl	Límite superior	
	<b>Reacción hibridación</b>	Reacción desnaturalización	Reacción desnaturalización: 2min	Tiempo	1 min	Límite inferior
					3 min	Límite superior
		Reacción desnaturalización	Reacción desnaturalización: 95°C	Temperatura	94°C	Límite inferior
96°C					Límite superior	
Reacción hibridación		Incubación a 52°C en termociclador	Tiempo	25 min	Límite inferior	
				35 min	Límite superior	

## Material y Métodos

Proceso	Paso del proceso	Método	Párametro	Testado	Condición
	Reacción hibridación	Incubación a 52°C en termociclador	Temperatura	51°C	Límite inferior
				53°C	Límite superior
	Mantener	Incubación a 52°C en termociclador	Temperatura	51°C	Límite inferior
				53°C	Límite superior

Tabla 21. Condiciones testadas (límite inferior y límite superior) correspondientes a cada uno de los pasos a seguir en el proceso de marcaje.

Proceso	Paso del proceso	Método	Párametro	Testado	Condición
<b>Preparación SAPE</b>	Mezclar SAPE y SAPE dilution	Agitación a máxima velocidad	Tiempo	3 seg	Límite inferior
				5 seg	Límite superior
	Centrifugar SAPE	Centrifugación a mínima velocidad (400g)	Tiempo	3 seg	Límite inferior
				5 seg	Límite superior
<b>Preparación marcaje de la placa</b>	Preparar mix marcaje, volume de SAPE	Pipeteo manual	Volumen	2.25 µl	Límite inferior
				3.75 µl	Límite superior
	Mezclar mix de marcaje	Agitación a máxima velocidad	Tiempo	3 seg	Límite inferior

## Material y Métodos

Proceso	Paso del proceso	Método	Párametro	Testado	Condición
	Mantener la mix de marcaje hasta su dispensación	Almacenamiento en oscuridad	Tiempo	5 seg	Límite superior
				30 min	Límite inferior
				35 min	Límite superior
	Dispensar mix de marcaje	Pipeteo manual	Tiempo	Dispensación inmediata	Límite inferior
				5 min	Límite superior
	<b>Reacción marcaje</b>	Reacción de marcaje	Incubación a 52°C en termociclador	Tiempo	8 min
12 min					Límite superior
Reacción de marcaje		Incubación a 52°C en termociclador	Temperatura	51°C	Límite inferior
				53°C	Límite superior

Tabla 22. Condiciones testadas (límite inferior y límite superior) correspondientes al paso de adquisición de los datos en el Luminex.

Proceso	Paso del proceso	Método	Párametro	Testado	Condición
<b>Adquisición de datos en Luminex</b>	Tiempo máximo de transferencia desde el marcaje al Luminex	Incubación a temperatura ambiente en Luminex	Tiempo	Transferencia inmediata	Límite inferior
				10 min	Límite superior

## Material y Métodos

	Temperatura de adquisición de datos en Luminex	Incubación a 52°C en Luminex	Temperatura	51°C	Límite inferior
				53°C	Límite superior

### 3.9 Estudio de estabilidad a temperatura extrema (estabilidad al “estrés”)

El diseño del estudio siguió la guía CLSI EP25-A (Evaluación de la estabilidad de los reactivos de diagnóstico *in vitro*), y se evaluó el impacto en la estabilidad del test tras someterlo a temperatura extremas durante su transporte.

Para ello los reactivos que conforman el kit se sometieron a ciclos de estrés de temperatura. Los dos ciclos de temperatura evaluados cubrían una condición de temperatura elevada ( $25 \pm 3^\circ\text{C}$ ), considera elevada ya que la temperatura de almacenamiento de los kits es  $2-8^\circ\text{C}$ , y dos ciclos de congelación / descongelación durante un período de 3 días. Los kits se almacenaron previamente durante 9 meses a  $2-8^\circ\text{C}$  antes de realizar sobre ellos los ciclos de estrés.

La condición de  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  se realizó en estufa y la condición congelada  $-20 \pm 5^\circ\text{C}$  en congelador. Ambas condiciones se llevaron a cabo en instrumentos donde la temperatura estaba controlada y monitorizada. Después de someterles a estas condiciones de estrés los kits se almacenaron a  $2-8^\circ\text{C}$  durante el tiempo que duró el estudio.

El rendimiento de los reactivos se evaluó la primera semana después de completar los ciclos de estrés (T9: 9 meses después de la fabricación) y después fueron almacenados a  $2-8^\circ\text{C}$  y se analizaron los tiempos T12, T13, T15 y T16 meses desde la fabricación del kit. Es decir, el kit con una edad de 9 meses (T9) se almacenó a  $2-8^\circ\text{C}$  durante 3 meses y se analizó cuando su edad fue 12 meses (T12), así sucesivamente con los tiempos T13, T15 y T16.

En cada tiempo se testaron 20 réplicas del panel de muestras y fue realizado por un operador, en un mismo termociclador y equipo Luminex durante el tiempo que duró el estudio.

Para cada condición de punto de tiempo y estrés, se confirmó que los fenotipos predichos para todas las muestras de ADN genómico y las réplicas fuesen 100% correctos.

### 3.10 Estudio de reproducibilidad

El diseño del estudio se realizó siguiendo las recomendaciones de la guía CLSI EP05-A3 (Evaluación de la precisión de los procedimientos de medición cuantitativa) y su objetivo fue evaluar la reproducibilidad del test.

Con el diseño del estudio se estimó la variabilidad observada en tres condiciones: 1.- día a día dentro del laboratorio, 2.- interlaboratorio y 3.- dentro del experimento. Evaluar estas tres condiciones fue particularmente relevante porque en ensayos manuales como nuestro test, donde la variabilidad de operador a operador, de instrumento a instrumento y / o de laboratorio a laboratorio puede desempeñar un papel importante

El estudio de reproducibilidad se realizó replicando el mismo análisis en tres sitios de investigación diferentes:

- Sitio 1\_BSTA: Servicio de Inmunohematología. Banco de sangre y tejidos de Aragón
- Sitio 2\_QC: Company Departamento Quality Control en Progenika Biopharma. A Grifols Company.
- Sitio 3\_TX: Grifols Biomat - San Marcos Lab (Texas – USA).

En cada lugar hubo un operador distinto que realizó un procesamiento en 6 días no consecutivos, por lo tanto, un total de 6 procesamientos en un período de al menos 20 días por lugar. Un ejemplo del cronograma para el estudio que se envió a cada lugar se muestra en la Tabla 23.

Tabla 23. Ejemplo de cronograma enviado a cada lugar.

Número de la semana	Día de la semana				
	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes
<b>Semana 1</b>	Run 1, Día1				Run 2, Día 5
<b>Semana 2</b>		Run 3, Día 9		Run 4, Día 11	
<b>Semana 3</b>			Run 5, Día 17		
<b>Semana 4</b>	Run 6, Día 22				

Los 3 lugares usaron el mismo lote de reactivos, es decir, el lote de kit 3201020003 y los lotes de enzima polimerasa 154010915 y 154013297. El panel de muestras de ADN, los kits necesarios y el protocolo de trabajo fueron enviados a cada uno de los lugares. En el envío de estos reactivos se incluyó un “data logger” que registraba los datos de temperatura durante su transporte para garantizar la temperatura a 2-8°C.

En cada procesamiento se realizaron 4 réplicas del panel de muestras de ADN genómico y una réplica de los controles positivos y un control negativo. Para cada sitio y entre sitios, se analizaron

los resultados y se confirmaron que los fenotipos predichos para todas las muestras de ADN genómico y sus réplicas fuese el esperado. Los criterios de aceptación para el estudio eran *Antigen Call rate*  $\geq 95\%$  y *Correct Calls*  $\geq 99\%$ .

### 3.11 Evaluación del rendimiento del test a partir de muestras individuales (*Performance evaluation of individual samples*)

Este estudio evaluó el rendimiento de ID RHD XT en comparación con los métodos de referencia (serología con marcado CE y secuenciación bidireccional por el método dideoxi de Sanger (BDS)).

El número total de muestras que se analizaron fueron 1000, distribuidas siguiendo las recomendaciones del Anexo de las Especificaciones Técnicas Comunes 2009/108 / CE para un producto de lanzamiento de la lista A.

- 10% de muestras clínicas (100)
- 2% de muestras neonatales (20)
- 16% de donantes tipadas serológicamente como *Weak D* (160)
- 71.7% de donantes *random* (717)

Se aumentó el número de muestras fenotípicamente *Weak D* analizadas con el test, debido al uso previsto del test, y así validar, aún más, su rendimiento con muestras específicas

Todas las muestras eran ADN genómico extraído de muestras clínicas de sangre total enviadas por cada uno de los 3 centros colaboradores (Banco de Sangre y Tejidos de Aragón (BSTA), Centro Vasco de Transfusiones y Tejidos Humanos (CVTTH) y *Sanquin Blood Supply* (SBS) en Ámsterdam) junto con sus datos serológicos. Recibidas las muestras se realizó la extracción del ADN mediante QIAamp DNA Blood Mini Kit y se cuantificó mediante el espectrofotómetro NanoDrop™ 8000 (Thermofisher scientific). El manejo que se realizó de las muestras fue siguiendo las medidas de seguridad adecuadas a la exposición a posibles agentes infecciosos presentes en las sangres, por lo que se utilizó doble guante, bata, gafas y campana de seguridad biológica.

Cada uno de los centros fue responsable de proporcionar muestras anónimas, informar a los individuos y / o sus familiares sobre los objetivos del estudio, informar sobre el uso de sus muestras, es decir, fueron responsables de la obtención del consentimiento informado por escritos de los individuos y/o sus familiares, así como de obtener la aprobación del comité de ética correspondiente.

## Material y Métodos

Las muestras se analizaron a ciegas y una vez obtenidos los resultados de fenotipo predichos de RHD se compararon con los resultados de fenotipo enviados por los distintos centros colaboradores y obtenidos de los datos de serología.

En el caso de muestras *Weak D* (n = 160), sus resultados fueron comparados con los datos de serología y con los datos de secuenciación bidireccional. La mayoría de los reactivos serológicos de rutina para D no distinguen entre los subtipos de *Weak D*, sólo detectan la disminución en el nivel de antígeno D expresado en los glóbulos rojos. Por lo tanto, se requieren métodos moleculares como la secuenciación bidireccional Sanger para comparar los tipos *Weak D tipo 1*, 2 y 3 analizados por el test.

Los resultados de fenotipo predichos obtenidos con el test para los antígenos HPA1a y HPA1b sólo se compararon con los resultados de la secuenciación bidireccional Sanger en las muestras *Weak D* (160 muestras inicialmente determinadas por la serología más otras 3 muestras confirmadas por secuenciación bidireccional).

El rendimiento del test se evaluó en términos de **sensibilidad** (capacidad del test para detectar las variantes) y **especificidad** (capacidad del test de para detectar las variantes correctamente) para el grupo sanguíneo HPA-1; y de **precisión** (medida del grado de reproducibilidad o de repetitividad del método analítico en condicionales normales de funcionamiento) para el grupo sanguíneo Rh, así como en el “*call rate*” y “*system failure rate*” (tasa de fallo del sistema).

El estudio se realizó con un lote de ID RHD XT, un lote de enzima (151039708) y un operador. En cada placa junto con las muestras se analizaron los controles de procesamiento (ID RHD CONTROL 1 y ID RHD CONTROL 2 y Negative Control). Por parte de los centros, las pruebas de serología fueron realizadas con reactivos de diagnóstico *in vitro* que cumplieran con las normativas europeas de marcado CE, y con los que se determinaron los fenotipos del antígeno D (Tabla 24).

## Material y Métodos

Tabla 24. Pruebas serológicas con marcado CE utilizadas por cada centro con los que determinaron el fenotipo del antígeno D (RH1) Banco de Sangre y Tejidos de Aragón (BSTA), Centro Vasco de Transfusiones y Tejidos Humanos (CVTTH) y *Sanquin Blood Supply* (SBS).

CVTTH	BSTA	SBS
Anti-D Duo (IgG+IgM). Anti-D Fast (IgM)	Anti-D Duo (IgG+IgM). Anti-D Fast (IgM)	
ImmuClone Anti-D Rapid IgM (Immucor). Clone RUM-1 (Ref. 557-5. Rev.05/13)	ImmuClone Anti-D Rapid IgM (Immucor). Clone RUM-1 (Ref. 557-5. Rev.05/13)	Pelikloon (Sanquin) clone MS201 (Ref.K1113) Poly (Immucor).
Anti-D(IgG+IgM). NovaClone (Immucor). Ref. NC12A Rev. 02/2015	Anti-D(IgG+IgM). NovaClone (Immucor). Ref. NC12A Rev. 02/2015	

Los tres centros utilizaron dos Anti-D para todos los donantes (primer nivel) y para las muestras D negativas (al menos con uno de los dos anti-D) fueron confirmadas con un método de *Weak D* (segundo nivel). Las muestras *Weak D* detectadas no se pudieron distinguir entre *Weak D* o *Partial D*, ni los subtipos de cada categoría.

### 3.12 Evaluación del rendimiento del test a partir de mezclas de muestras de sangre y de ADN (*Performance evaluation of pooled donor samples*).

El objetivo con las muestras de sangre fue validar el ensayo de genotipado ID RHD XT para ser utilizado como una herramienta para el análisis de muestras agrupadas D-C/E+ en la rutina clínica. Y, por otro lado, el objetivo con las muestras de ADN de donaciones serotipadas C/E+ y

## Material y Métodos

previamente genotipadas como negativas. Weak D o Parcial D por otro método molecular, fue validar la precisión del ensayo de genotipado (ID RHD XT).

Este estudio se realizó con la colaboración de 4 centros italianos de distintas regiones del país (Figura 30) quienes enviaron muestras de sangre o ADN.



Figura 30. Mapa donde se localizan los 4 centros italianos colaboradores.

El estudio se dividió en distintas fases con sus respectivas tareas, como se detalla a continuación:

### FASE 1. Selección de muestras de interés (realizada por los 4 centros)

#### TAREA 1.1. Búsqueda de muestras donantes/donaciones

- Seleccionar donantes / donaciones D-C + / E + y donantes / donaciones serotipadas C/E+ y previamente genotipadas como negativas. Weak D o Parcial D por otro método molecular.
- Recopilar los datos de serología y / o genotipado previos de RHD y RHCE.
- Tipo de muestras: ADN o sangre total.
  - Requisitos para las muestras de sangre: volumen mínimo necesario 2 ml y se conservó y envió a 2-8°C.
  - Requisitos para las muestras de ADN: volumen mínimo de 25 µl a una concentración mínima de 20 ng / µl, conservado -20°C y enviado a 2-8°C o -20°C. Las muestras se etiquetaron con el código correspondiente para la trazabilidad de los datos.

---

### TAREA 1.2. Información de los donantes/donaciones seleccionados.

- Recopilar los datos de serología y/o genotipado del donante el grupo Rh (antígenos D, C, c, E y e) y los test utilizados.
- Recopilar información sobre la etnicidad de los donantes, si es posible.

### FASE 2. Recolección y envío de muestras. (realizada por los 4 centros)

---

#### TAREA 2.1 Recolección de muestras biológicas.

Las muestras de sangre se tomaron en tubos de vacutainers con anticoagulante EDTA. El máximo de tiempo de almacenamiento de las muestras hasta su envío fue de 7 días. Teniendo en cuenta los datos mencionados en la *tarea 1.1*, se enviaron aproximadamente 5 tubos por semana, lo que significa el procesamiento de grupos de 20 muestras cada 2 semanas. Por lo tanto, el período de almacenamiento de sangre que se validó a 2-8 °C fue durante al menos 1 mes.

Las muestras de ADN deben almacenarse (y enviarse) a -20°C.

---

#### TAREA 2.2 Envío de muestra a PROGENIKA BIOPHARMA

Las muestras de sangre se enviaron a 2-8°C en un plazo máximo de 1 semana y las muestras de ADN a -20°C. Además, el envío de muestras (ADN o sangre) debe ir acompañado de los datos correspondientes del donante, mencionados en la sección anterior (1.2).

### FASE 3. Recepción y tratamiento de muestras.

---

#### TAREA 3.1 Recepción y almacenamiento de muestras.

Las muestras de sangre almacenaron a 2-8°C durante un tiempo máximo de un mes o hasta la recepción de 20 muestras, número máximo de muestras que conforman una mezcla. También se realizaron mezclas más pequeñas dependiendo del número de muestras enviadas por los centros en el plazo máximo de 1 mes de almacenamiento de las mismas.

---

#### TAREA 3.2 Preparación de las mezclas de muestras.

- Sangre: se mezclaron 200 µL de cada sangre hasta un número máximo de 20 en un tubo de 5mL.
- ADN: Cada ADN individual tenía una concentración equivalente mínima de 20 ng/µL. Se mezclaron de 5-10 µL de cada ADN hasta un número máximo de 20 muestras. El volumen mezclado dependió de la disponibilidad del ADN stock.

## Material y Métodos

El número de grupos (20) se seleccionó porque previamente se analizó la sensibilidad de ID RHD XT en la detección de la presencia del gen *RHD* en grupos formados por distinto número de muestras, siendo 20 el número de muestras donde los resultados fueron 100% correctos. Además, se evaluó la frecuencia observada en la población caucásica en muestras, con los mismos criterios de selección que las de nuestro estudio (D-C + / E), con presencia del gen *RHD* (Daniels. 2013).

### TAREA 3.3 Extracción del adn a partir de sangre total.

La extracción de ADN se realizó con el QIAamp DNA Blood Mini kit a partir de 200 µL y siguiendo el protocolo del fabricante. También se extrajo el ADN de cada tubo de sangre individual como control del proceso.

### FASE 4. Análisis de las muestras con ID RHD XT

Todos los ADN extraídos de las mezclas de sangre y las muestras de ADN enviadas, se analizaron con el test basado en la tecnología Luminex® xMAP. En cada experimento se analizaron las distintas mezclas junto con controles positivos y negativos.

### FASE 5. Análisis de los resultados no concluyentes

Los resultados de muestras positivas para el gen *RHD*, pero no concluyentes con ID RHD XT, se resolvieron con la tecnología de secuenciación de nueva generación (Next Generation Sequencing-NGS) empleando la plataforma MiSeq de Illumina (Giollo M., 2015; Tilley L. 2014). Mediante esta tecnología secuenciaremos los exones completos de RHD y RHCE y las regiones intrónicas adyacentes. La principal ventaja que nos aportará el uso de la tecnología NGS es la detección de polimorfismos no incluidos en ID RHD XT, tanto polimorfismos descritos como no descritos previamente (Lane W., 2016; Liu Z., 2014). La secuenciación NGS consta de las siguientes fases:

#### A. Preparación de la librería

Para ello, en nuestro caso esta librería se preparó mediante la realización de dos PCRs consecutivas. En la primera se amplifican las regiones de interés y se añaden 2 tags (una en el extremo 5' y otra en el 3'). Y en la segunda PCR se incluyen una etiqueta específica (index) para la identificación de cada muestra, que permitirá la secuenciación de varias muestras de forma simultánea, y un adaptador que será necesario para secuenciarse en el MiSeq.

## Material y Métodos

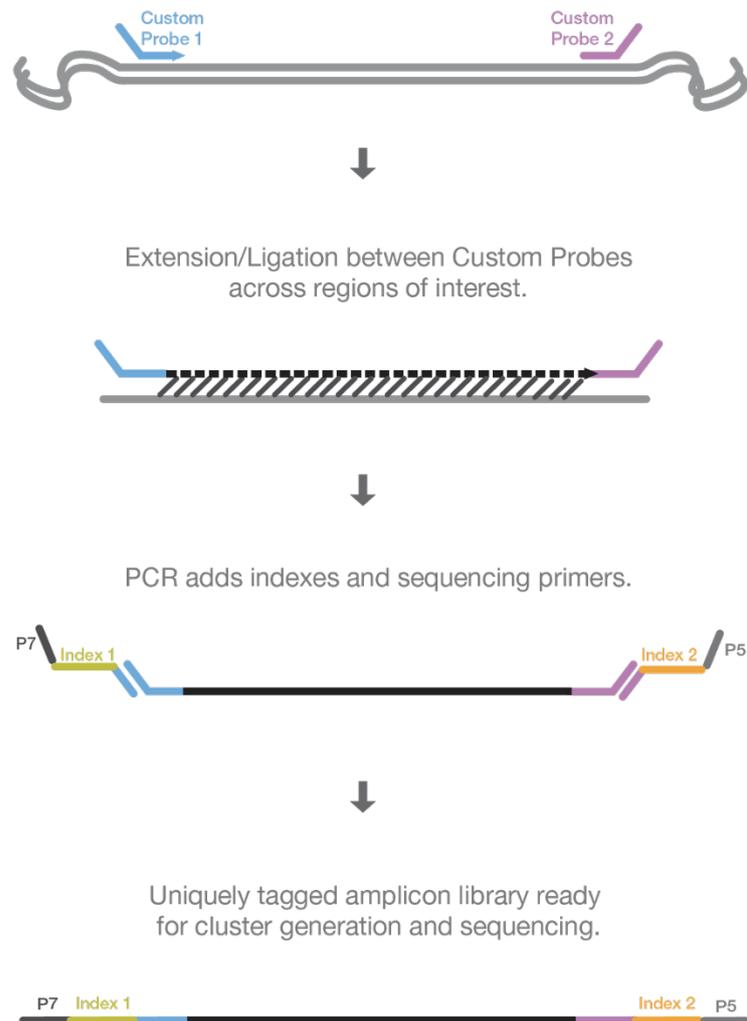


Figura 31. Resumen de la preparación de librería mediante 2 PCR's consecutivas.

Para ello se realizaron los siguientes pasos:

### A.1 Amplificación del adn e inclusión de las tags: PCR I

La PCR I estaba conformada por dos grupos de primers, el grupo A y el grupo B. Cada grupo estaba formado por primers que amplificaban los 10 exones del gen *RHD* y *RHCE*, así como el intron 2 donde se localiza el híbrido *RHCE* (3-9) y el gen de la hormona de crecimiento (*HGH*). Ambos grupos amplificaban las mismas regiones, pero los primers eran distintos entre los grupos, es decir, el tener dos grupos es una medida preventiva por si fallase un grupo en el procesamiento, estaba el otro.

La amplificación de *HGH*, al igual que en el test ID RHD XT, se incluyó como control positivo de amplificación para evitar un falso RHD negativo. Los dos grupos de primers se diseñaron de manera independiente, es decir, si en uno de los grupos fallaba la amplificación por presencia de

## Material y Métodos

alguna variante que impedía la amplificación de manera óptima de alguno de los exones, se tenía el otro grupo para poder dar un resultado correcto

Este diseño, en gran medida redundante, se pensó que podría resultar útil debido a la complejidad del sistema sanguíneo Rh, muy polimórfico, codificado por dos genes. *RHD* y *RHCE*, que comparten un 93.8% de homología en todos los intrones y exones codificantes (Gordana *et al.* 2019).

### A.2 Purificación de la PCR I

---

Se llevó a cabo mediante el reactivo ExoSAP-IT (ThermoFisher scientific). Este reactivo permitió eliminar los primers y nucleótidos en exceso. El protocolo consistió en dos incubaciones, la primera a 37°C durante 30 minutos, donde las enzimas del reactivo digieren los primers en exceso y se desfosforilaron los nucleótidos y la segunda a 80°C durante 15 minutos para inactivar a continuación dichas enzimas.

### A.3 Amplificación de ADN: PCR II

---

A partir del producto purificado de la PCR I se realizó la PCR II. En la PCR II se incluyeron los adaptadores P5 y P7 de Illumina y los llamados index, secuencia de 8 nucleótidos conocida que sirve para identificar cada una de las muestras (Figura 32).



Figura 32. Dibujo esquemático de la unión los adaptadores P5 y P7 y el index al producto purificado obtenido de la PCR I.

### A.4 Purificación de la PCR II

---

El producto de la PCR II se purificó y normalizó (para tener la misma cantidad de producto de PCR en todas las muestras) mediante las placas de normalización SequalPrep (Thermo Fisher Scientific). Para ello todo el volumen de la PCR II se purificó siguiendo el protocolo establecido por el proveedor. Estas placas presentan una superficie de unión a ácido nucleico cargada que es "reversible" al cambiar el pH del tampón circundante. A un pH bajo, la superficie está cargada positivamente y se une a los grupos fosfato cargados negativamente, lo que permite la

## Material y Métodos

eliminación fácil de proteínas y otros contaminantes mediante un simple paso de lavado (Invitrogen. 2008).

### A.5 Cuantificación de la PCR II

---

Se realizó una mezcla de todas las muestras amplificadas, purificadas y normalizadas con el grupo A de primers y otra mezcla con las muestras del grupo B. Estos dos grupos se cuantificaron con el fluorímetro Qubit® (ThermoFisher scientific) porque se necesitaba cuantificar únicamente los fragmentos de doble cadena a concentraciones inferiores al límite permitido por el Nanodrop anteriormente utilizado (2.5-3700 ng). A partir de los datos obtenidos se realizaron los cálculos necesarios para poder diluir la librería tuviera una concentración final de 3nM.

### B. Secuenciación en MISEQ (ILLUMINA)

Obtenida la librería, se procedió a su preparación para su posterior uso en el MiSeq (Illumina). Para ello llevamos a cabo un proceso de desnaturalización con NaOH a 0.2N (lisis alcalina) produciendo la ruptura de los enlaces de hidrógeno entre las bases del ADN lo que origina las cadenas monocatenarias. Se mezcló en relación volumen 1:1 la librería a 3nM con NaOH (0.2N), se dejó 5 minutos a temperatura ambiente y se diluyó en tampón HT1 (Hybridation buffer. Illumina) frío hasta una concentración de 15 pM.

En paralelo, se preparó el control "PhiX control v3" (Illumina), siguiendo los mismos pasos de desnaturalización que la librería y llevándolo a 20pM. Este control sirve como referencia para calcular la calidad de la generación de clústeres, de la secuenciación y la alineación. El genoma de PhiX es pequeño, lo que permite una alineación rápida, además, dado que su secuencia es conocida y su contenido GC está equilibrado (contiene aproximadamente un 45% de GC y un 55% AT), permite la estimación de las tasas de error de la secuenciación. Una vez desnaturalizados y llevados a la concentración final del PhiX 20pM y de la de la librería 15pM, se mezclaron en una proporción de 550 µL de la librería a 15pM y 50µL de PhiX a 20pM.

A continuación, se diluyeron con el buffer HT1 los primers necesarios para la secuenciación de nuestra librería (ya que las tags incluidas en la PCR de su preparación es diferente a las secuencias habitualmente utilizadas por Illumina), que se incluirán en el reactivo que ya contiene los 3 primers habituales de Illumina (y que son los que servirán para secuenciar el control PhiX), que son:

Primer 1: primer para la para la secuenciación de la hebra forward (read 1).

Primer 2: para la secuenciación del index.

Primer 3: primer para la para la secuenciación de la hebra reverse (read 2).

## Material y Métodos

Con todos los reactivos preparados se procedió a depositarlos en el cartucho proporcionado en MiSeq Reagent Kit v3. Se siguieron las instrucciones para cargar cada reactivo en la casilla correspondiente, es decir, en la posición 17 llamada LOAD SAMPLE (Figura 32) se cargó la librería combinada con el PhiX, en la posición 12, el primer 1 en la posición 13 el primer 2, y en la posición 14 el primer 3.

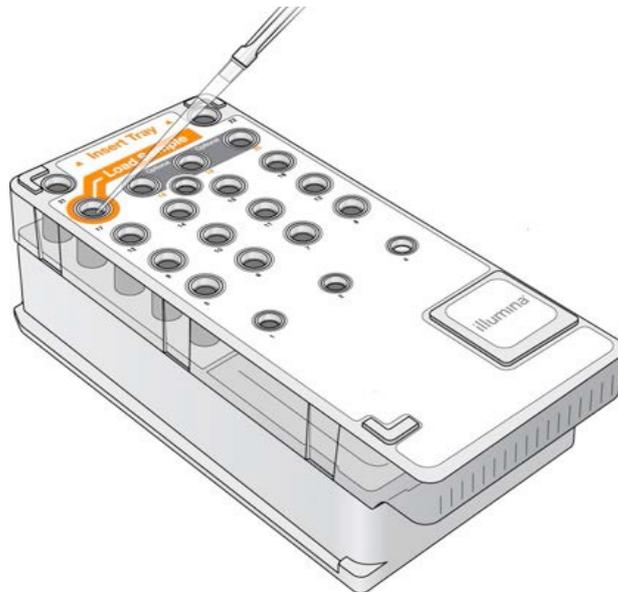


Figura 32. Cartucho del MiSeq Reagent Kit v3 donde se depositan los reactivos necesarios para realizar la secuenciación (primers y librería combinada con PhiX).

Preparado el cartucho se procedió a introducirlo en el Miseq junto con la flow cell incluida en el kit MiSeq Reagent Kit v3 (Figura 33).

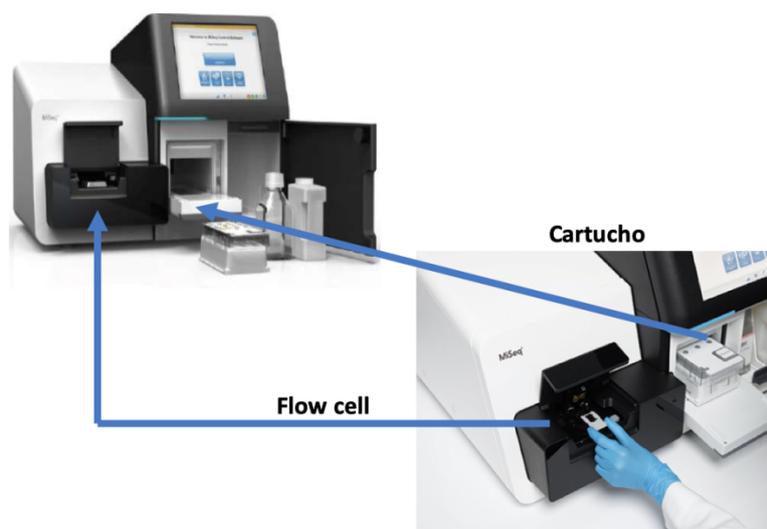


Figura 33: Detalle del donde se colocan la flow cell y el cartucho en el MiSeq.

## Material y Métodos

La flow cell es una lámina rectangular de vidrio (similar a un portaobjetos de microscopía óptica) que contiene pequeños canales fluídicos, a través de los cuales se bombea las polimerasas, los dNTP y los buffers. Dentro de los canales se localizan los oligonucleótidos cortos complementarios a las secuencias adaptadoras (Figura 34). La librería de ADN que contiene los adaptadores se diluye e hibrida con estos oligonucleótidos, inmovilizando temporalmente las cadenas de ADN individuales en la flow cell (Illumina. 2016).

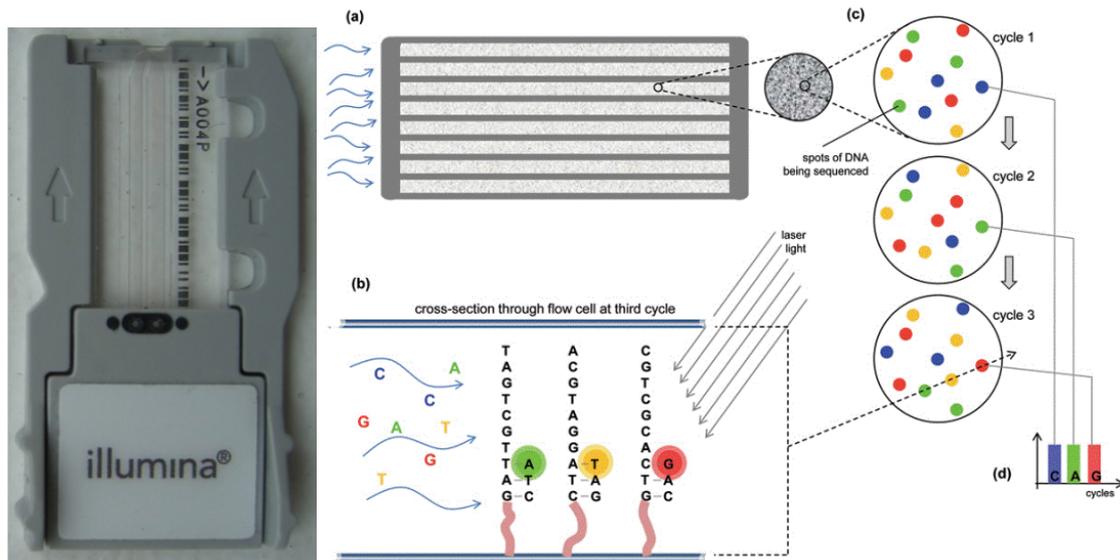


Figura 34. Imagen de la flow cell de Illumina formado por canales fluídicos donde se localizan los oligonucleótidos cortos complementarios a las secuencias adaptadoras.

Previo a la secuenciación se lleva a cabo la amplificación del ADN mediante la llamada "PCR en puente", que emplea ciclos de extensión del primer seguidos de desnaturalización química (Figura 35). La amplificación se origina con el primer complementario ligado en la flow cell donde queda retenido para posteriormente este fragmento de DNA actúa como primer para comenzar la secuenciación.

Las librerías de ADN se hibridan en el flow cell y esto da como resultado una separación física entre las hebras de ADN permitiendo a la ADN polimerasa la amplificación, produciendo múltiples copias de los fragmentos de ADN o clusters (Figura 35) (López de Heredia, 2016).

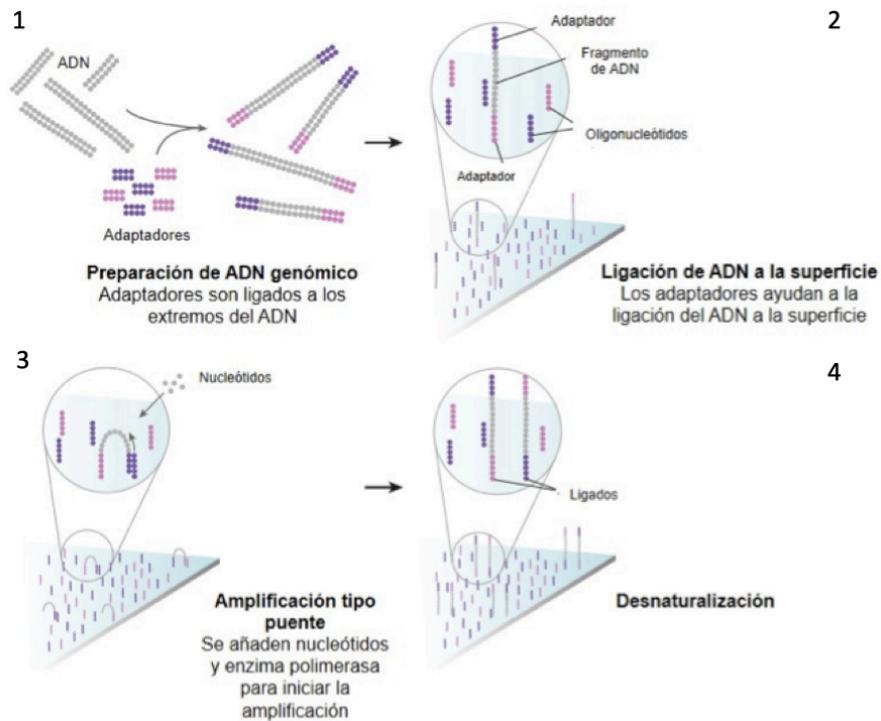


Figura 35. Secuenciación por síntesis Illumina. 1) Preparación de ADN genómico. El ADN se fragmenta y los adaptadores son ligados a los extremos del ADN. 2) El ADN se une a la superficie. Los fragmentos monocatenarios se unen en la flow cell. 3) PCR en puente. Se añaden los nucleótidos no marcados y la polimerasa para iniciar la amplificación. 4) Desnaturalización de las moléculas de doble hebra.

Cada cluster contiene aproximadamente un millón de copias del fragmento original, suficiente para emitir una señal con la intensidad óptima para ser detectada cada vez que se incorpora un nucleótido durante el proceso de secuenciación.

La secuenciación por síntesis, como es llamada la metodología de secuenciación de la plataforma Illumina, requiere la incorporación de una mezcla de los 4 nucleótidos en cada canal de la flow cell junto con la ADN polimerasa y los primers. Asimismo, la secuenciación por síntesis utiliza nucleótidos modificados con un fluoróforo reversible en el extremo 3'-OH que hace que estén químicamente bloqueados, impidiendo que otro nucleótido se añada a la nueva cadena hasta que ese no sea eliminado (Mardis, 2008).

Al final de cada ciclo se realiza una captura de una imagen ("fotograma") en la que se identifica el nucleótido añadido, a continuación, se elimina el resto de fluoróforos y los bloqueantes se escinden, lo que permite incorporar otra base y así, cíclicamente, se continúa la síntesis de la hebra de ADN y la secuenciación. Como cada base contiene un fluoróforo (color) diferente, la

## Material y Métodos

secuencia de ácido nucleico se interpreta mediante un software de análisis de imágenes a medida que avanzan los "fotogramas" (Mardis, 2008).

El número de ciclos fue 300 y la secuenciación *paired-end*, es decir, se secuenció el fragmento amplificado por ambos extremos. Esta secuenciación ofrece una ventaja a la hora de realizar el alineamiento contra el genoma de referencia, ya que permite estimar el tamaño del fragmento original y situarlo con mayor precisión en el genoma mejorando así la cobertura de las zonas de interés y también resulta útil a nivel de detección de eventos estructurales (Figura 36).

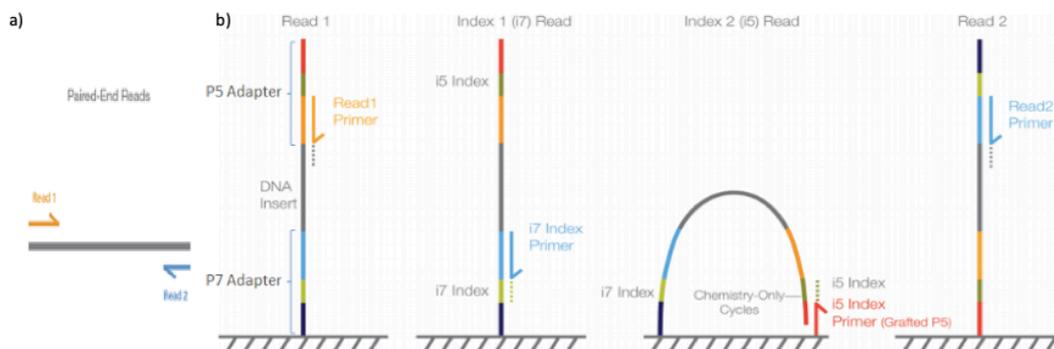


Figura 36, a) Esquema de las lecturas paired-end (R1 y R2), b) Formación de las lecturas paired-end mediante PCR-puente.

### C. Análisis de datos

En primer lugar, con los archivos FASTQ se realizó un control de calidad mediante la herramienta FastQC que determina si los archivos cumplen los mínimos de calidad para poder continuar con el análisis. El parámetro que se tuvo en cuenta fue el denominado "*Per base sequence quality*" que permite ver los valores de calidad para cada base en cada posición. A continuación, se realizó lo que llamamos pre-procesado en donde se mejoran las secuencias leídas mediante el uso de la herramienta denominada "Cutadapt" que permite eliminar la secuencia de los adaptadores de Illumina, así como secuencias no deseadas por presentar lecturas cuya longitud son menores a 100 pares de bases (parámetro establecido previamente). Obtenidos los fastq mejorados se realizó el alineamiento de las lecturas obtenidas frente a nuestra secuencia de referencia mediante el programa Tablet (programa de dominio público). Estas lecturas se ordenan mediante la herramienta samtools obteniéndose los archivos BAM, donde se llevó a cabo el proceso de detección de variantes y el de filtrado, proceso donde se establecieron una serie de criterios de calidad a las muestras encontradas para así evitar dar resultados incorrectos.

### Resultados

En este capítulo describimos los resultados obtenidos del diseño del test de genotipado sanguíneo. ID RHD XT, que permite la identificación de antígenos eritrocitarios (antígeno D) y antígenos plaquetarios humanos (HPA) de manera simultánea. En concreto, detecta los polimorfismos que determinan seis variantes del gen *RHD*, y del sistema plaquetario determina las variantes HPA-1a y HPA-1b.

Comenzaremos describiendo los resultados obtenidos en la “Fase 1: Diseño y optimización del test de genotipado sanguíneo (ID RHD XT)”, a continuación, se exponen los resultados de la “Fase 2: Desarrollo del prototipo”, donde se evaluó el proceso de fabricación y los diversos controles de calidad realizados a los distintos componentes. Y, por último, la “Fase 3: Validación del test”, donde se presentan los resultados de los distintos estudios necesarios

#### Fase 1: Diseño y optimización del test de genotipado sanguíneo (ID RHD XT)

##### 1. Test de genotipado ID RHD XT

La detección genética de las variantes seleccionadas del gen *RHD*: *RHD\*weak D type 1*, *RHD\*weak D type 2*, *RHD\*weak D type 3*, deleción *RHD*, *RHD\* Pseudogen ( $\psi$ )* y *RHD\*DIlla-CE (3-7)-D* y del gen *ITGB3* (sistema HPA-1): *HPA1a* y *HPA1b* fueron determinadas con el test. Este ensayo consiste en una serie de pasos, descritos previamente de manera detallada en el apartado Materiales y Métodos, que se pueden resumir en:

- Amplificación mediante PCR multiplex.
- Hibridación y marcaje.
- Detección de la señal con la tecnología Luminex® 200™.
- Análisis de los resultados mediante software desarrollado para el test ID RHD XT.

Los pasos “*Amplificación mediante PCR multiplex*” y “*Hibridación y marcaje*” se fueron diseñando y testando en paralelo ya que están totalmente interrelacionados. A continuación, se va ir describiendo los resultados obtenidos hasta llegar el diseño final del test de genotipado.

## 1.1 Diseño de sondas oligonucleotídicas

### A. Diseño (PROBE SET) PS13

Las sondas testadas en este diseño incluyeron el cambio 8C>G (rs144969459) en la posición chr1:25272555 (GRCh38.p12) que se localiza en el exón 1 correspondiente al locus *RHD*. La Figura 41 muestra la discriminación entre los 3 genotipos en 6 diseños distintos de sondas. Los resultados observados indican que la discriminación varía mucho entre los diferentes diseños. La diferencia entre los diseños eran varios como su longitud (pb), si el diseño estaba realizado en la hebra directa o en complementaria y la presencia de inosina en otros polimorfismos adyacentes, así como la centralización o descentralización del polimorfismo en la secuencia de la sonda (Tabla 25).

Tabla 25. Diferencias en los diseños de sondas testadas para el PS13. Marcado en verde el diseño válido.

PS13			
Nombre	Hebra	Tamaño (pb)	Polimorfismo
A	Complementaria	19	descentrado
B	Directa	19	centrado
C	Complementaria	21	descentrado
D	Directa	21	centrado
E	Complementaria	23	descentrado
F	Directa	23	centrado

Así, por ejemplo, el diseño PS13\_D es uno de los peores porque la discriminación entre los 3 grupos no es correcta. Si se observan los puntos en la gráfica de la Figura 37 de este diseño (cruces de color morado), que corresponden con el genotipo 3 (homocigoto normal), están entre 0.9-0.7 y muy dispersos si se comparan con los ratios del PS13\_C (0.9-1.0), que fue finalmente la opción elegida. Igualmente, en esta opción el genotipo 1 (homocigoto variante) su discriminación mejora notablemente, existiendo una mayor distancia entre los genotipos 2 - 1 (heterocigoto - homocigoto mutante).

Además, en la opción PS13\_C se cumplió el criterio de aceptación, los valores de las MFIs en las muestras heterocigotas deben tener señales de MFI (Median Fluorescence Intensity)  $\geq 3000$ . Así, se obtuvieron valores de MFI para la sonda del PS13\_C del alelo variante (MFI1) de ~7000 y para el alelo frecuente o normal (MFI2) de ~6500.

## Resultados

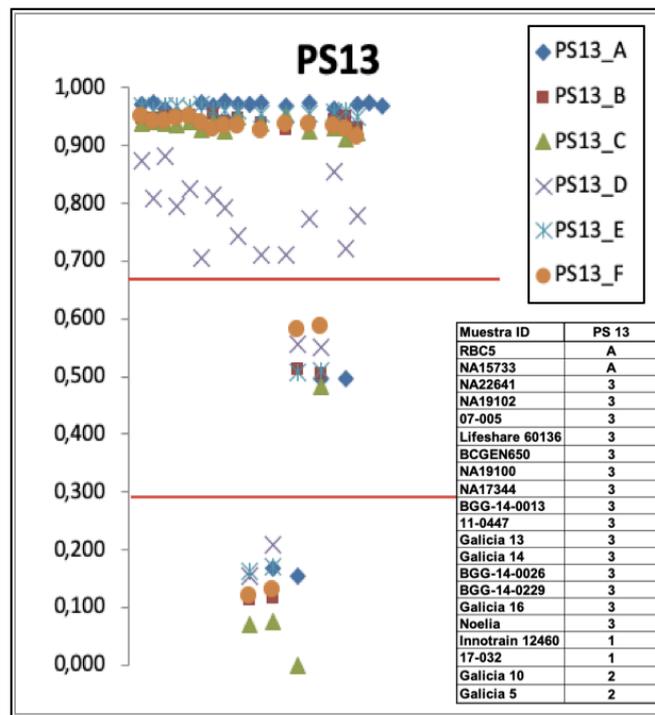


Figura 41. La Figura muestra 6 diseños distintos (PS13\_A-F) del PS13, probe set correspondiente a genotipo RHD\*weak D type 3. En el eje Y se muestran los valores que diferencian los tres grupos de genotipos siendo el valor cercano a 1 para el genotipo 3 (homocigoto normal), el cercano a 0.5 para el genotipo 2 (heterocigoto) y el cercano a 0 para el genotipo 1 (homocigoto mutante). En el eje X están representadas las muestras que se testaron, su genotipo de referencia está en la leyenda del gráfico. Las líneas rojas están separando el espacio permitido para genotipar cada uno de los 3 posibles genotipos. El diseño final de sondas para el PS13\_C por ser la mejor discriminación entre los 3 genotipos.

### B. Diseño (PROBE SET) PS56

Para el probe set 56, las sondas testadas incluyeron el cambio 807T>G (rs141833592) en la posición chr1:25303327 (GRCh38.p12) que se localiza en el exón 6 correspondiente al locus RHD. Al igual que con el anterior PS el diseño de sondas se diferencia en el tamaño, la localización del polimorfismo y en que hebra fue diseñada la sonda (Tabla 26).

Tabla 26. Diferencias en los diseños de sondas testadas para el PS56. Marcado en verde el diseño seleccionado finalmente.

PS56			
Nombre	Hebra	Tamaño (pb)	Polimorfismo
A	Directa	22	centrado
B	Complementaria	22	descentrado
C	Directa	20	descentrado
D	Complementaria	20	centrado

## Resultados

En este caso la pareja de sondas elegida fue el diseño llamado PS56\_D por presentar la mejor discriminación obtenida entre los 3 genotipos (diamantes azules en la Figura 42). Los ratios en cada uno de los genotipos están muy cercanos al teórico, es decir, el ratio del genotipo 3 dio un valor de 0.97, el ratio correspondiente al genotipo 2 dio un valor de 0.46 y el ratio del genotipo 1 dio un valor 0.11.

Analizadas los valores de las MFIs en las muestras heterocigotas los valores superaron el criterio de aceptación de señales de MFI de 3000, siendo en la MFI 1 (alelo variante) ~7000 y la MFI2 (alelo frecuente) de ~6500.

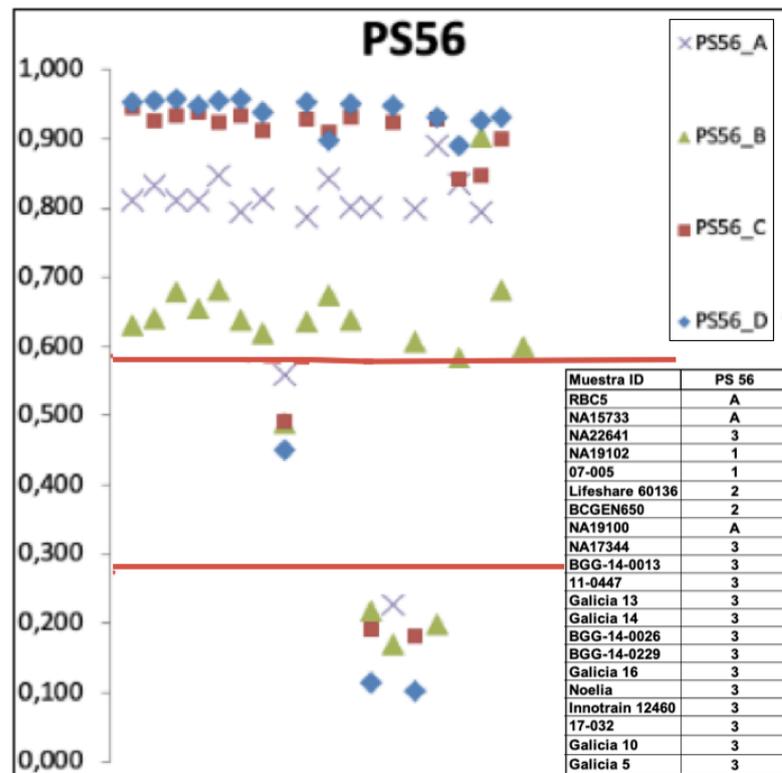


Figura 42. La Figura muestra 4 diseños distintos (PS56\_A-D) del PS56. En el eje Y se muestran los valores que diferencian los tres grupos de genotipos siendo el valor cercano a 1 para el genotipo 3 (homocigoto normal), el cercano a 0.5 para el genotipo 2 (heterocigoto) y el cercano a 0 para el genotipo 1 (homocigoto mutante). En el eje X están representadas las muestras que se testaron, su genotipo de referencia está en la leyenda del gráfico. Las líneas rojas están separando el espacio permitido para genotipar cada uno de los 3 posibles genotipos. El diseño final de sondas corresponde al PS56\_D por ser la mejor discriminación entre los 3 genotipos.

### C. Diseño (PROBE SET) PS56

Para el probe set 58 las sondas testadas incluyeron el cambio 809T>G (rs121912763) en la posición chr1:25303329 (GRCh38.p12) que se localiza en el exón 6 correspondiente al locus RHD. Al igual que con el anterior PS el diseño de sondas se diferencia en el tamaño, la localización del polimorfismo y en que hebra fue diseñada la sonda (Tabla 27).

## Resultados

Tabla 27. Diferencias en los diseños de sondas testadas para el PS56. Marcado en verde el diseño válido.

PS58			
Nombre	Hebra	Tamaño (pb)	Polimorfismo
A	Directa	23	centrado
B	Complementaria	23	descentrado
C	Directa	21	descentrado
D	Complementaria	21	descentrado

En la Figura 43 los puntos de color rojo (PS58\_B) muestran la mejor discriminación de entre las opciones testadas y por tanto fue la opción elegida. En cuanto a sus valores de MFI, en las muestras heterocigotas, la MFI1 y MFI2 resultaron de señales de MFI de 8500 y 9500 respectivamente.

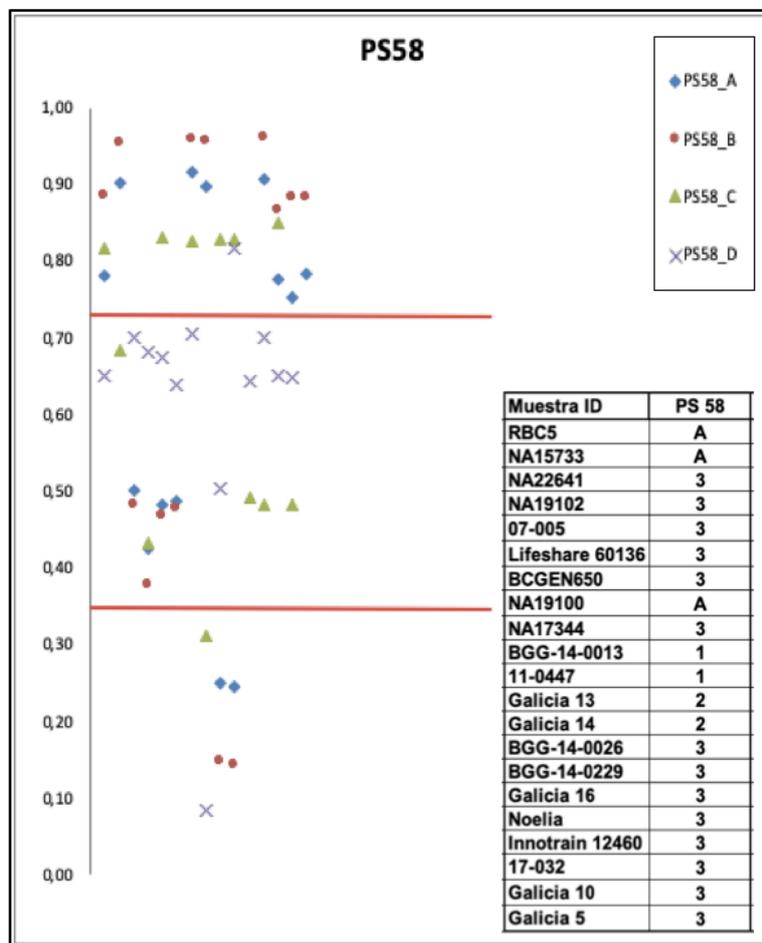


Figura 43. La Figura muestra 4 diseños distintos (PS56\_A-D) del PS56. En el eje Y se muestran los valores que diferencian los tres grupos de genotipos siendo el valor cercano a 1 para el genotipo 3 (homocigoto normal), el cercano a 0.5 para el genotipo 2 (heterocigoto) y el cercano a 0 para el genotipo 1 (homocigoto mutante). En el eje X están representadas las muestras que se testaron, su genotipo de referencia está en la leyenda del gráfico. Las líneas rojas están separando el espacio permitido para genotipar cada uno de los 3 posibles genotipos. El diseño final de sondas corresponde al PS56\_D por ser la mejor discriminación entre los 3 genotipos.

## Resultados

### D. Diseño (PROBE SET) PS80

Para el probe set PS80 las sondas testadas incluyeron el cambio 1154G>C (rs71652374) en la posición chr1:25321889 (GRCh38.p12) que se localiza en el exón 9 correspondiente al locus RHD. En la Tabla 28 se muestran las diferencias entre los diseños testados.

**Tabla 28. Diferencias en los diseños de sondas testadas para el PS80. Marcado en verde el diseño seleccionado finalmente.**

PS80			
Nombre	Hebra	Tamaño (pb)	Polimorfismo
A	Complementaria	19	descentrado
B	Directa	19	centrado
C	Complementaria	21	descentrado
D	Directa	21	centrado
E	Complementaria	23	descentrado
F	Directa	23	centrado

La Figura 44 muestra la discriminación entre los 3 genotipos en 6 diseños distintos de sondas. Si observamos cada uno de los diseños, la discriminación varía mucho entre ellos así, por ejemplo, el diseño PS80\_B es uno de los peores porque la discriminación entre los 3 grupos no es precisa. Los puntos en la gráfica de este diseño, que corresponden con el genotipo 3 (homocigoto normal), están entre 0.6-0.7, al igual que el genotipo 2 (heterocigoto), cuyos valores están entre 0.3-0.4, es decir, en ambos genotipos ese ratio empeora porque la sonda correspondiente a la secuencia con la variante híbrida inespecíficamente y hace que el ratio disminuya. En cambio, la discriminación de la pareja de sondas definitivas (PS80\_F: puntos naranjas en la Figura 40 donde la distancia entre los genotipos 3 - 2 (homocigoto normal – heterocigoto) y 2 -1 (heterocigoto-homocigoto mutante) es mayor que en el resto de diseños y, por tanto, la discriminación y la distancias entre los 3 genotipos, mejora considerablemente.

A continuación, se analizaron los valores de MFI de las muestras heterocigotas, las cuales cumplieron con el criterio de aceptación establecido de al menos 3000. En este caso, los valores para la sonda del PS80\_F correspondientes al alelo variante fue de ~5200 y de 6100 para el alelo frecuente o normal.

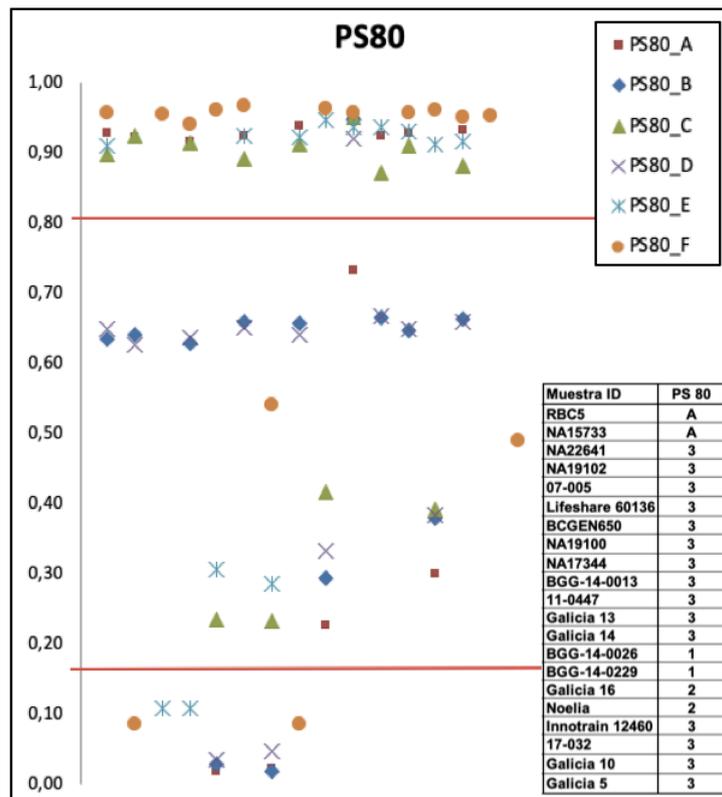


Figura 44. La Figura muestra 6 diseños distintos (PS80\_A-F) del PS80. En el eje Y se muestran los valores que diferencian los tres grupos de genotipos siendo el valor cercano a 1 para el genotipo 3 (homocigoto normal), el cercano a 0.5 para el genotipo 2 (heterocigoto) y el cercano a 0 para el genotipo 1 (homocigoto mutante). En el eje X están representadas las muestras que se testaron, su genotipo de referencia está en la leyenda del gráfico. Las líneas rojas están separando el espacio permitido para genotipar cada uno de los 3 posibles genotipos. El diseño final de sondas corresponde al PS80\_F por ser la mejor discriminación entre los 3 genotipos.

## E. Diseño (PROBE SET) PS117

Para el probe set PS117 las sondas testadas incluyeron el cambio 176 T>C (rs5918) en la posición chr17:47283364 (GRCh38.p12) en el locus ITGB3. En la Tabla 28 se muestran las diferencias entre los diseños testados. En este PS se analizaron dos sets de sondas (denominadas PS117\_A y PS117\_B) cuya única diferencia fue su tamaño (pb) siendo la PS117\_A de 17 nucleótidos y la PS117\_B de 18 (Tabla 29).

## Resultados

Tabla 29. Diferencias en los diseños de sondas testadas para el PS117. Marcado en verde el diseño seleccionado finalmente.

PS117			
Nombre	Hebra	Tamaño (pb)	Polimorfismo
<b>A</b>	<b>Complementaria</b>	<b>17</b>	<b>centrado</b>
B	Complementaria	18	centrado

En este caso, la diferencia de discriminación entre las dos sondas era muy similar (Figura 45), y esto no fue lo que determinó la elección de la pareja de PS117\_A, sino la diferencia de señal (valores de MFIs) entre ambos diseños (Tabla 30).

En este caso, la diferencia de discriminación entre las dos sondas era muy similar (Figura 45), y esto no fue lo que determinó la elección de la pareja de PS117\_A, sino la diferencia de señal (valores de MFIs) entre ambos diseños (Tabla 30).

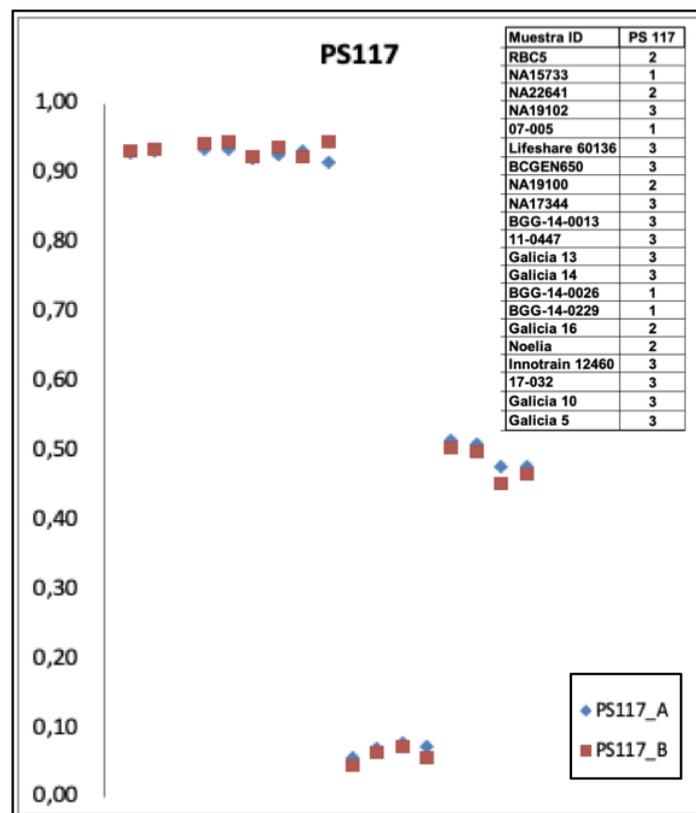


Figura 45. La figura muestra 2 diseños distintos (PS117\_A-B) del PS117. En el eje Y se muestran los valores que diferencian los tres grupos de genotipos siendo el valor cercano a 1 para el genotipo 3 (homocigoto normal), el cercano a 0.5 para el genotipo 2 (heterocigoto) y el cercano a 0 para el genotipo 1 (homocigoto mutante). En el eje X están representadas las muestras que se testaron, su genotipo de referencia está en la leyenda del gráfico. Las líneas rojas están separando el espacio permitido para genotipar cada uno de los 3 posibles genotipos. El diseño final de sondas corresponde al PS117\_A.

## Resultados

Tabla 30. Valores de MFI para los 3 posibles genotipos en el PS117 con dos sondas de tamaño distinto. Sonda A: 17pb y Sonda B: 18 pb.

PS 117			
Sondas (pb)	Valores de MFI		
	Homocigoto normal	Heterocigoto	Homocigoto variante
A (18)	14000	13000	13000
B (17)	7000	4000	6000

### F. Diseño (PROBE SET) PS193

Para este probe set se testaron 3 diseños, denominados A, B y C, que diferían en el número de nucleótidos (Tabla 31).

Tabla 31. Diferencias en los diseños de sondas testadas para el PS193. Marcado en verde el diseño válido.

PS193			
Nombre	Hebra	Tamaño (pb)	Polimorfismo
<b>A</b>	<b>Complementaria</b>	<b>23</b>	<b>centrado</b>
B	Complementaria	25	centrado
C	Complementaria	27	centrado

Como se muestra en la Tabla 32 cualquiera de los 3 diseños resultó con valores similares de MFI en las muestras con genotipo presente, es decir, las muestras cuyo ratio indica la presencia de cada exón del gen RHD. Con estos resultados la opción elegida fue la A, que correspondía con la pareja de sondas con menor número de nucleótidos.

Tabla 32. Valores de MFI obtenidas en 3 diseños distintos para el PS193.

PS193			
Genotipo	Nombre del diseño de sondas		
	A	B	C
ausentes	396	482	323
presentes	7309	7317	7153

### G. Diseño (PROBE SET) PS194

El probe set 194 genotipa el locus HGH. La utilidad de amplificar HGH, fue como control positivo de amplificación para evitar un falso RHD negativo (por ejemplo, cuando el gen RHD no está delecionado pero su amplificación es negativa). Se testaron dos diseños distintos (Tabla 33).

## Resultados

En este caso sólo se consideró los resultados de los valores de MFI. Si se observa la Tabla 34 se comprenderá por qué el diseño elegido fue el A (marcado en verde): en el diseño B existe mucha variabilidad entre los valores de MFI entre las muestras procedentes de las líneas celulares y las muestras obtenidas mediante la tecnología denominada WGA (Whole Genome Amplification) empleando el Illustra™ Ready-To-Go™ GenomiPhi™ V3 DNA Amplification Kit (GE Healthcare).

Tabla 33. Valores de MFI obtenidas en 3 diseños distintos para el probe set PS194.

PS194		
Nombre	Hebra	Tamaño (pb)
A	Directa	21
B	Complementaria	21

Tabla 34. Valores de MFI obtenidas con los 2 diseños distintos para el PS194, gen HGH.

P194		
Nombre del diseño de sondas		
Muestra	A	B
BC131_1	9528	5068
BC131_2	9696	5102
BC131_3	9717	5031
NA14706_1	9958	10478
NA14706_2	10349	10486
NA14706_3	10364	10648
NA17344_1	9479	7474
NA17344_2	9606	7854
NA17344_3	9355	7676
NA22641_1	9612	6680
NA22641_2	9792	6788
NA22641_3	9238	6766

### 1.2 Diseño de primers específicos y optimización del buffer de PCR

Tanto el diseño de primers específicos como la optimización del buffer de PCR están ligados, ya que ambos están interrelacionados y juegan un papel esencial en conseguir una amplificación específica del gen RHD, lo cual es un principio fundamental para el correcto genotipado.

En cuanto a los primers, que amplifican las regiones que contenían los SNPs de interés, se diseñaron secuencias oligonucleotídicas complementarias a las regiones intrónicas específicas

## Resultados

del gen RHD (Tabla 35). Las secuencias de los primers testados no aparecen descritas por ser propiedad intelectual e industrial de "Progenika Biopharma, a Grifols Company".

Tabla 35. Características de los primers testados (Tamaño del amplicón. T<sup>3</sup> melting. % de GC).

Gen	Exon / Intron	Tamaño Amplicon (pb)	sin TAGs		
			Primer ID	T melting	GC %
<i>RHD</i>	1	336	PIDR013F	56.83	52.63
			PIDR013R	57.21	42.86
	6	371	PIDR056058F	60.62	55.00
			PIDR056058R	58.55	55.00
	9	252	PIDR080F	55.14	34.78
			PIDR080R	57.29	28.57
Intron 3	193	PIDCP193F	51.79	24.00	
		PIDCP193R	55.77	30.77	
<i>HGH</i>	-	434	PIDR194F	64.80	52.00
			PIDR194R	62.85	46.15

Como se explicó en el apartado de Material y Métodos, uno de los puntos críticos que se tuvo en cuenta en su diseño, fue el tamaño de los amplicones. En este caso, seguimos la recomendación de Luminex, para evitar las limitaciones intrínsecas de la técnica referentes a la señal MFI (Median Fluorescence Intensity) obtenidas de los amplicones en la hibridación y la especificidad de la amplificación del gen RHD.

Los productos de PCR generados por estos primers se testaron mediante un análisis de fragmentos siguiendo la receta descrita en la Tabla 36 (a) y 36 (b). Cada pareja de primers se amplificó inicialmente mediante PCR uniplex y posteriormente se testó una PCR multiplex que contenía todos los primers.

Junto con los primers también se testaron dos buffers de PCR: el QIAGEN 10x PCR Buffer (Buffer H) y el 2.05x QIAGEN Multiplex custom buffer (Buffer Q).

Tabla 36 (a) y 36 (b) Tabla que muestra la mezcla de reactivos que se utilizaron y con los que se determinó el tamaño de los amplicones mediante análisis de fragmentos. La Tabla 36 (a) es la receta para el QIAGEN 10x PCR Buffer (Buffer H) y la Tabla 36 (b) para el 2.05x QIAGEN Multiplex custom buffer (Buffer Q).

## Resultados

Tabla 36 (a). Receta para el QIAGEN 10x PCR buffer (Buffer H)

Reactivo	Volumen (µl/reacc)
H2O	5,1
10x PCR Buffer	1,25
MgCl <sub>2</sub> 25mM	0,75
dNTPs 10mM	0,3
HotStartTaq Polimerasa	0,1
Primer mix 2uM	2
FAM-Tags 2uM	2
ADN (20ngul)	3,5
Volumen total reacción	15

Tabla 36 (b). Receta para el 2.05x Qiagen multiplex custom buffer (Buffer Q).

Reactivo	Volumen (µl/reacc)
2.05x Qiagen multiplex custom Buffer	7,5
Primer mix 2uM	2
FAM-Tags 2uM	2
ADN (20ngul)	3,5
Volumen total reacción	15

Tabla 37. Tamaño de los amplicones con y sin las TAGs de cada uno de las regiones de amplificación de interés.

Gen	Exon / Intron	Tamaño amplicon (pb)	
		sin TAGs	con TAGs
<i>RHD</i>	1	336	372
	6	371	407
	9	252	288
	Intron 03	193	229
<i>HGH</i>	–	434	470

El tamaño de los amplicones esperado se describe en la Tabla 37, donde se muestra el tamaño en pb de los amplicones con y sin TAGs (extensiones oligonucleotídicas en el extremo 5' de cada uno de los primers forward y reverse que están en la secuencia de los primers). En total deberían aparecer 5 picos en el análisis de fragmentos, cada uno correspondiente al tamaño con TAGs de cada amplicón.

## Resultados

### A. Resultados de los análisis de fragmentos

---

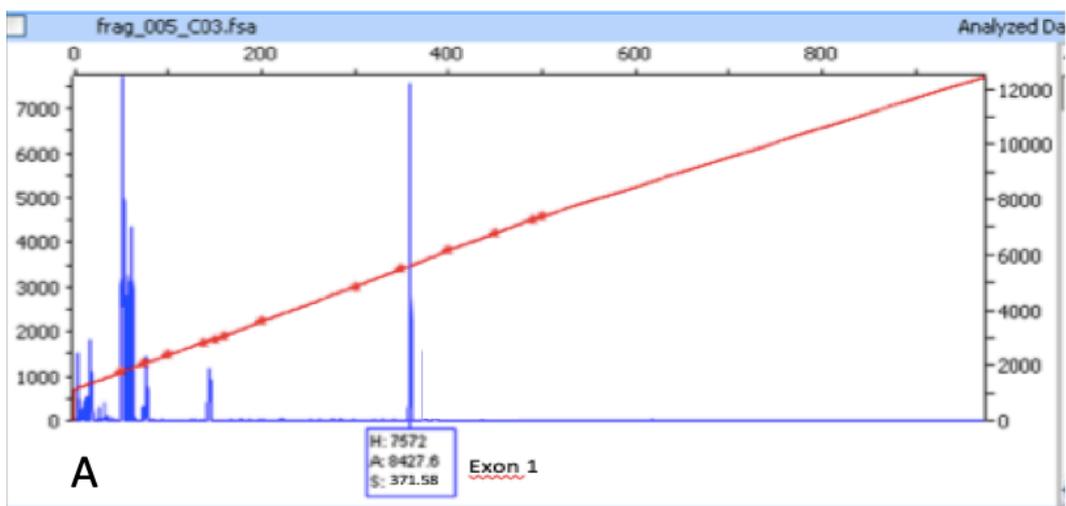
#### A.1) PCR uniplex con Buffer H

---

La Figura 46 (A. B. C) muestra el análisis de fragmentos de las amplificaciones obtenidas mediante PCR uniplex con el Buffer H. Los resultados se obtuvieron del análisis de una muestra RHD positiva, es decir, con el gen RHD presente y el gen HGH (gen de la hormona de crecimiento, con una secuencia altamente conservada en el genoma humano) siempre presente. En cada una de las Figuras aparece una línea diagonal roja con unos puntos marcados a lo largo de la misma que indican el tamaño del marcador de peso molecular utilizado (GeneScan™ 500 LIZ®). Este marcador de peso molecular está formado por los siguientes tamaños de fragmentos en pares de bases (pb) 35. 50. 75. 100. 139. 150. 160. 200. 300. 340. 350. 400. 450. 490. 500.

A su vez en cada diagrama aparecen unas líneas verticales azules que representan los fragmentos detectados. Se ha marcado en cada figura el fragmento que corresponde a cada uno de los exones o intrones del gen *RHD* esperado y del gen *HGH*.

Además, al principio de cada diagrama siempre aparecen una serie de líneas azules a bajas intensidades en comparación con los fragmentos detectados por parte del software de análisis. Estas líneas corresponden con fragmentos ilegibles o inutilizables que aparecen siempre al inicio de la lectura por parte del secuenciador, y a los que no, el software no asigna ningún tamaño.



## Resultados

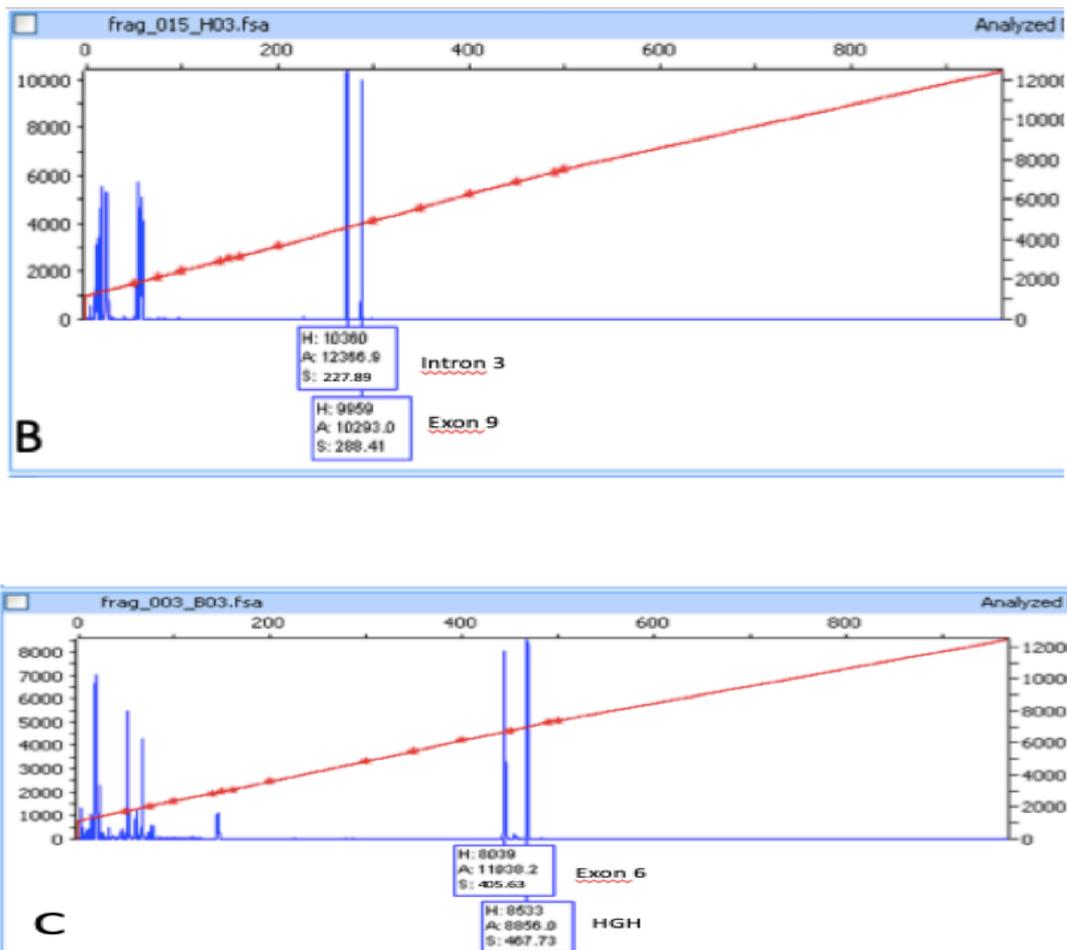


Figura 46 (A. B. C). Análisis de fragmentos de los amplicones de PCR uniplex con 10x *buffer PCR* (Buffer H). En el eje X se indica el tamaño del fragmento en pares de bases (S), el área del fragmento (A) y la altura del fragmento (H) y en el eje Y la intensidad de la amplificación de ese fragmento. En cada figura aparece una línea diagonal con unos puntos marcados correspondientes al tamaño del marcador de peso molecular (cuál)? Las primeras líneas verticales azules que aparecen al inicio de cada diagrama corresponden a fragmentos ilegibles por parte del software de análisis y a lo que no se les asigna ningún tamaño. A continuación, aparecen en cada figura otras líneas verticales con su correspondiente tamaño asignado por el software de análisis. Así, la Figura A corresponde con el resultado de la PCR uniplex de la pareja de primers del exón 1 del gen *RHD*, la Figura B corresponde con el exón 9 e intron 3 del gen *RHD* y la Figura C corresponde con el exon6 del gen *RHD* y el gen *HGH*.

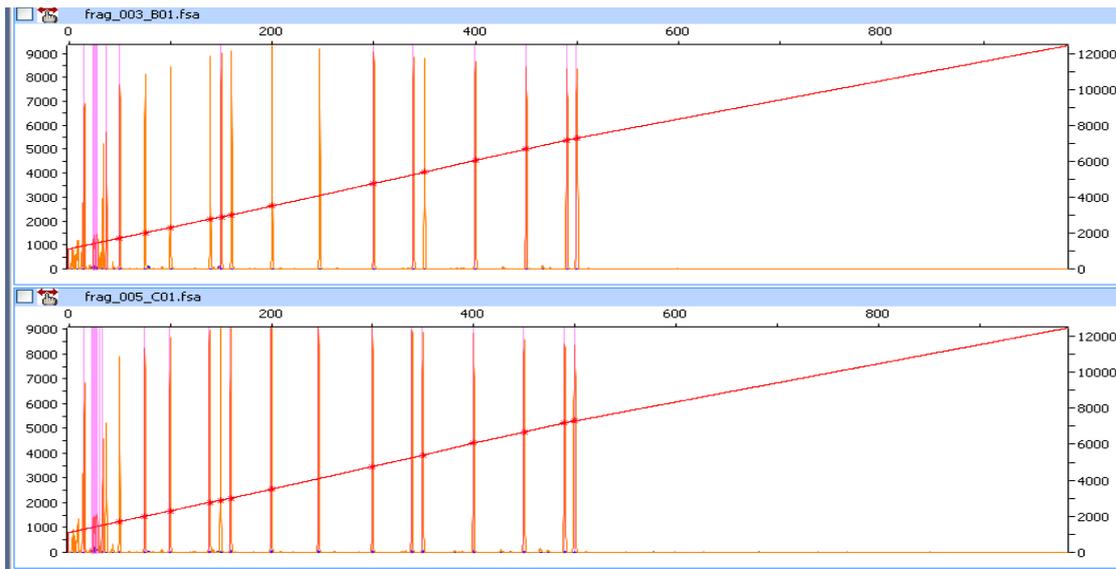
### A.2) PCR uniplex con Buffer Q

En la Figura 47 se muestra una línea diagonal roja y unas líneas verticales naranjas, ambas corresponden al marcador de peso molecular. GeneScan™ 500 LIZ®, utilizado en el análisis de fragmentos y formado por fragmentos de distinto tamaño como se ha indicado anteriormente. Con este Buffer Q no hubo resultado en el análisis de fragmentos por eso no se observan picos de color azul en la imagen. En la figura se ha querido mostrar las líneas verticales naranjas como

## Resultados

indicativo de que el ensayo de fragmentos se ha realizado con éxito y que la ausencia de líneas azules no es debido a un ensayo no válido.

Esta ausencia de resultado ocurrió tanto para el análisis de los amplicones mediante PCR uniplex como multiplex. Ante la posibilidad de que fuera un error experimental se decidió tener un resultado mediante un gel de agarosa y según los resultados obtenidos se repetía o no el análisis de fragmentos (ver “1.2.2 Resultados de los análisis en gel de agarosa”).



**Figura 47.** Análisis de fragmentos de los amplicones de PCR uniplex y multiplex con el 2.05X Qiagen Multiplex custom buffer (Buffer Q). El experimento no muestra ningún pico correspondiente a los tamaños de los amplicones. Los picos naranjas y la línea diagonal roja corresponden al marcador estándar GeneScan™ 500 LIZ.

### A.3 PCR multiplex con buffer H

En la Figura 48 se muestra, como en las figuras anteriores, una línea diagonal roja unos puntos marcados que indican el tamaño del marcador de peso molecular utilizado (GeneScan™ 500 LIZ®), y unas líneas verticales azules que corresponden con los amplificados, y cuya altura oscila en función de la intensidad de la amplificación de cada uno de los fragmentos. En concreto, estas líneas azules corresponden, como se indica en la Figura 36, con el exon1, exón 6, exón 9 e intron 3 del gen *RHD* y el gen *HGH*, amplificados correctamente al utilizar conjuntamente los primers específicos y Buffer H mediante PCR multiplex. La muestra utilizada al igual que antes, fue una RHD positiva.

## Resultados

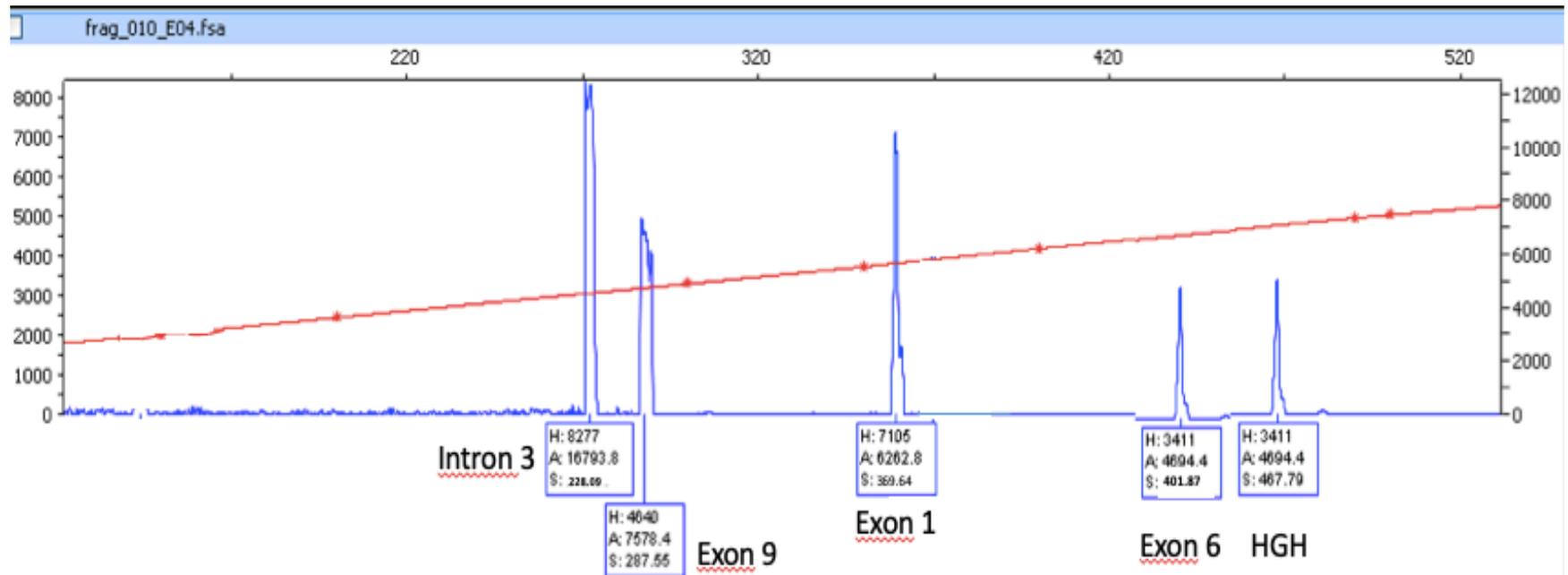


Figura 48. Análisis de fragmentos de la reacción multiplex para el exón 1, 6, 9 y el intrón 3 de *RHD* y *HGH* con Buffer H. En el eje X se indica el tamaño del fragmento en pares de bases (S), el área del fragmento (A) y la altura del fragmento (H) y en el eje Y la intensidad de la amplificación de ese fragmento. La línea roja diagonal corresponde con el marcador de peso molecular utilizado y las líneas verticales azules a distintas intensidades son el resultado de la amplificación de los 5 fragmentos del gen *RHD* mediante PCR multiplex. En cada tamaño obtenido se ha indicado a qué fragmento del gen corresponde.

## Resultados

### B. Resultados de los análisis en gel de agarosa

Con los mismos sets de primers que los utilizados en los análisis de fragmento se realizó una migración del producto de PCR multiplex obtenido mediante el uso combinado de primers y buffer de PCR en gel de agarosa al 3% (Figura 49). La muestra utilizada como control positivo de amplificación específica del gen *RHD* (NA14706), corresponde con una delección homocigota del gen *RHD*. Su genotipo para el gen *RHD* y el *RHCE* es ddcc. Con esta muestra se valora la especificidad resultante de la amplificación, por lo que sólo debería observar la banda correspondiente al amplicón HGH. Además, se utilizó el agua como Negative Control (llamado NC en la Figura 49).

Si observamos la Figura 49 los productos de PCR obtenidos con el buffer Q se localizan a la izquierda y a la derecha el buffer H. Con el buffer Q el resultado de la amplificación genera productos inespecíficos cuyo tamaño de banda corresponde al tamaño esperado de amplificación del gen *RHCE* (llave blanca en la Figura 49). A diferencia de la amplificación obtenida con el buffer H donde no se ha generado esa inespecificidad y, por tanto, la amplificación es específica del gen *RHD*.

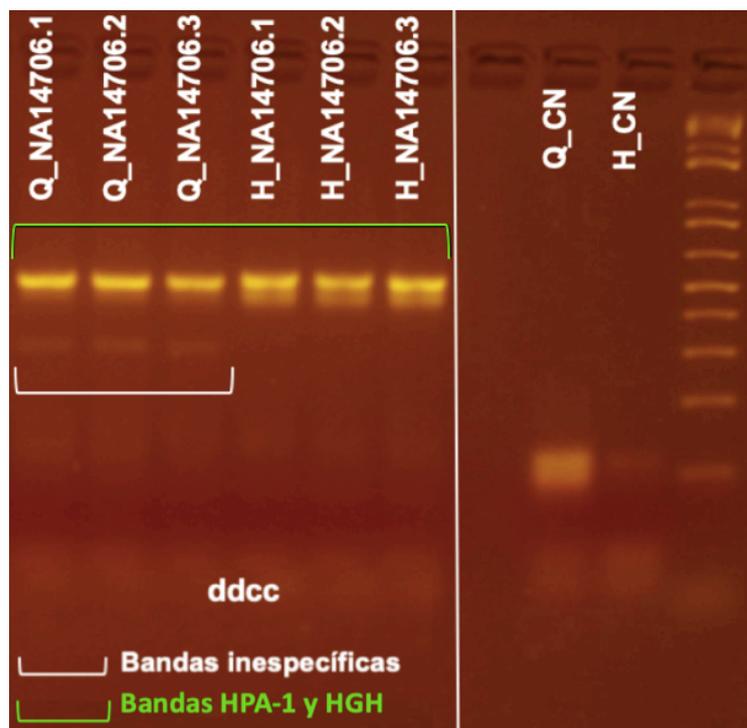


Figura 49. Resultado de los productos amplificados mediante PCR multiplex con los buffers de PCR. Q y H. El gel muestra los productos de PCR obtenidos en una muestra cuyo genotipo es ddcc (muestra con una delección homocigota del gen *RHD*) con los dos buffers de PCR testados. En primer lugar, aparecen 3 réplicas de la muestra NA14706 amplificada con el buffer Q, donde se observan unas bandas inespecíficas que corresponden con la amplificación del gen *RHCE*. A continuación, aparecen otras 3 réplicas que corresponden al buffer H y en donde no se observa esta amplificación inespecífica. Finalmente, se observan los dos controles negativos (NC) de cada uno de los buffers y el marcador de peso molecular.

## Resultados

En ambos casos se observan unas bandas intensas que corresponden a los amplicones de HPA 1 y HGH (llave verde en la Figura 49), utilizados como controles de amplificación del test, los cuales siempre están presentes tanto en muestras D+ como D-. Además, por debajo de los 100pb, en ambos buffers, aparecen unas bandas difusas que corresponden con dímeros de primers. La parte de la derecha del gel de agarosa muestra la migración de los controles negativos (NC) y el marcador de peso molecular.

Por último, se testaron ambos buffers con la tecnología XMAP de Luminex y los resultados fueron determinantes para seleccionar el buffer H, como mostramos a continuación:

Como se muestra en la Tabla 38 los resultados de los dos *buffers* en una muestra cuyo genotipo era *RHCE null*, es decir, no tenía que haber amplificación del gen *RHCE*, el buffer Q, produjo unas Median Fluorescence Intensities (MFIs) superiores tanto para el alelo variante (MFI1) como para el alelo referencia (MFI2) respecto al buffer H. Esto es un claro ejemplo de la inespecificidad en la amplificación de la PCR con este *buffer*. En cambio, con el buffer H, los valores obtenidos en ambas MFIs son valores similares a los que se obtienen con un control negativo (agua), es decir, en este caso la amplificación obtenida es únicamente del gen *RHD*.

Tabla 38. Resultados de amplificación inespecífica con buffer H y Q en una muestra cuyo genotipo es *RHCE null*. INT03 es la abreviatura de intron 3 del gen *RHD*. MFI 1 y MFI 2 (Median Fluorescence Intensity), la MFI 1 corresponde la señal generada por el conjugado (sonda-bead) del alelo variante y la MFI 2 corresponde la señal generada por el conjugado (sonda-bead) del alelo normal o frecuente.

<i>Buffer</i>	INT03	
	MFI 1	MFI 2
<b>H: 10x</b>	368	273
	360	312
	275	270
<b>Q: Multiplex</b>	2423	2201
	2119	1742
	1720	1439

Igualmente se obtuvo el mismo resultado de amplificación inespecífica con otra muestra cuyo genotipo era DdCc (Tabla 39).

## Resultados

Tabla 39. Resultados de amplificación inespecífica con los buffers H y Q (Multiplex Qiagen buffer) en una muestra cuyo genotipo es DdCc.

<i>Buffer</i>	INT03	
	MFI 1	MFI 2
<b>H: 10x</b>	225	283
	334	351
	275	233
<b>Q: Multiplex</b>	1779	1620
	1707	1539
	2153	1867

A la vista de resultados descritos quedaron definidos qué primers y qué buffer de PCR se incluían en la receta de la mezcla llamada PCR Master Mix (PMM), es decir, el buffer H y los primers definidos en la Tabla 35 anteriormente explicada.

### 1.3 Optimización del Biotin-11-dctp y volumen de sape (protocolo de marcaje)

Tras la elección de los primers y el buffer de la PCR, el siguiente objetivo fue optimizar las condiciones del marcaje de los productos de PCR amplificados con Biotin-11-dCTP para su posterior revelado con estreptavidina-ficoeritina (SAPE), por lo que la puesta a punto de estos reactivos se realizó simultáneamente.

En el caso del Biotin-11-dCTP se testaron 3 concentraciones distintas del reactivo en la mix de PCR: 1X(1mM). 1.5X (1.5 mM) y 2X (2mM). A su vez también se testaron dos volúmenes de SAPE: 3 y 3.5  $\mu$ L en un volumen final en la mix de marcaje (SAPE DILUTION BUFFER + SAPE) de 90  $\mu$ L.

Las Figuras 50 (A). 50 (B). 50 (C), muestran todas las condiciones testadas en cada uno de los probe sets (PS), es decir, un total de 6 condiciones (1X + 3  $\mu$ L. 1X + 3.5  $\mu$ L. 1.5X + 3  $\mu$ L. 1.5X + 3.5  $\mu$ L. 2X + 3  $\mu$ L y 2X + 3.5  $\mu$ L). La Figura 50 (A. B. C) muestra la variación en la discriminación entre los 3 genotipos posibles (homocigoto alelo común, homocigoto alelo variante, heterocigoto) en función de la cantidad de biotina y SAPE. En concreto, el óvalo rojo de la grafica PS117 está señalando muestras correspondientes al genotipo homocigoto para el alelo común o genotipo 3; si se observa estos puntos vemos como la ratio de discriminación, es decir, la proporción obtenida entre las MFIs, de este genotipo empeora al incrementarse la concentración de biotina independientemente del volumen de SAPE, ya que los puntos desplazados y corresponden a la condición 2X de biotina con 3 y 3.5  $\mu$ L de SAPE.

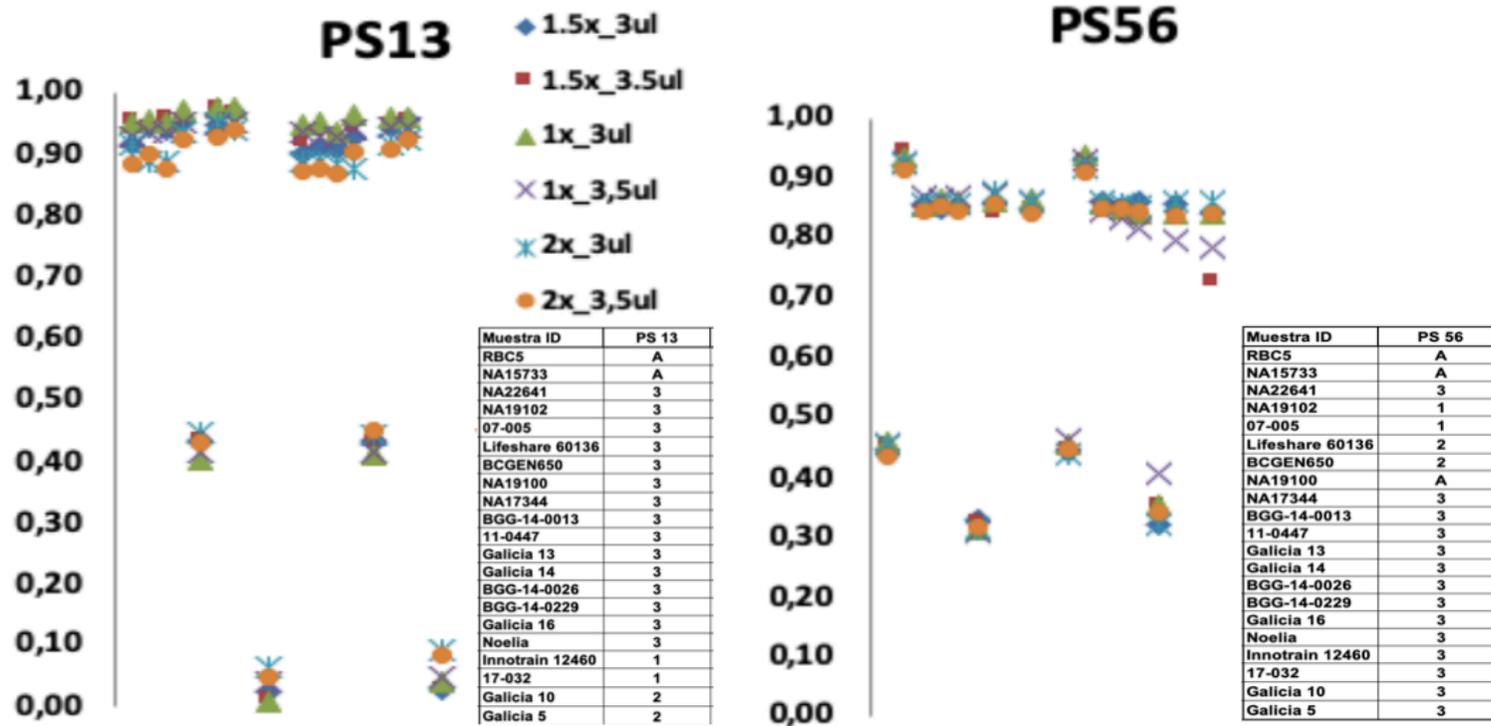


Figura 50 (A). Las representaciones de las discriminaciones de cada uno de los probe sets (PS) testado con cada condición de concentración de biotina y volumen de SAPE. PS 13 es el probe set correspondiente a genotipo *RHD\*weak D type 3*; PS 56 es el probe set correspondiente al genotipo *RHD\*Pseudogene*. En total 6 condiciones fueron testadas: 1X + 3  $\mu$ L. 1X + 3.5  $\mu$ L. 1.5X + 3  $\mu$ L. 1.5X + 3.5  $\mu$ L. 2X + 3  $\mu$ L y 2X + 3.5  $\mu$ L. En el eje X están representadas las muestras que se testaron, su genotipo de referencia está en la leyenda del gráfico. En el eje Y se muestran los valores que diferencian los tres grupos de genotipos siendo el valor cercano a 1  $\rightarrow$  genotipo 3 (homocigoto normal), el cercano a 0.5  $\rightarrow$  genotipo 2 (heterocigoto) y el cercano a 0  $\rightarrow$  genotipo 1 (homocigoto mutante).

## Resultados

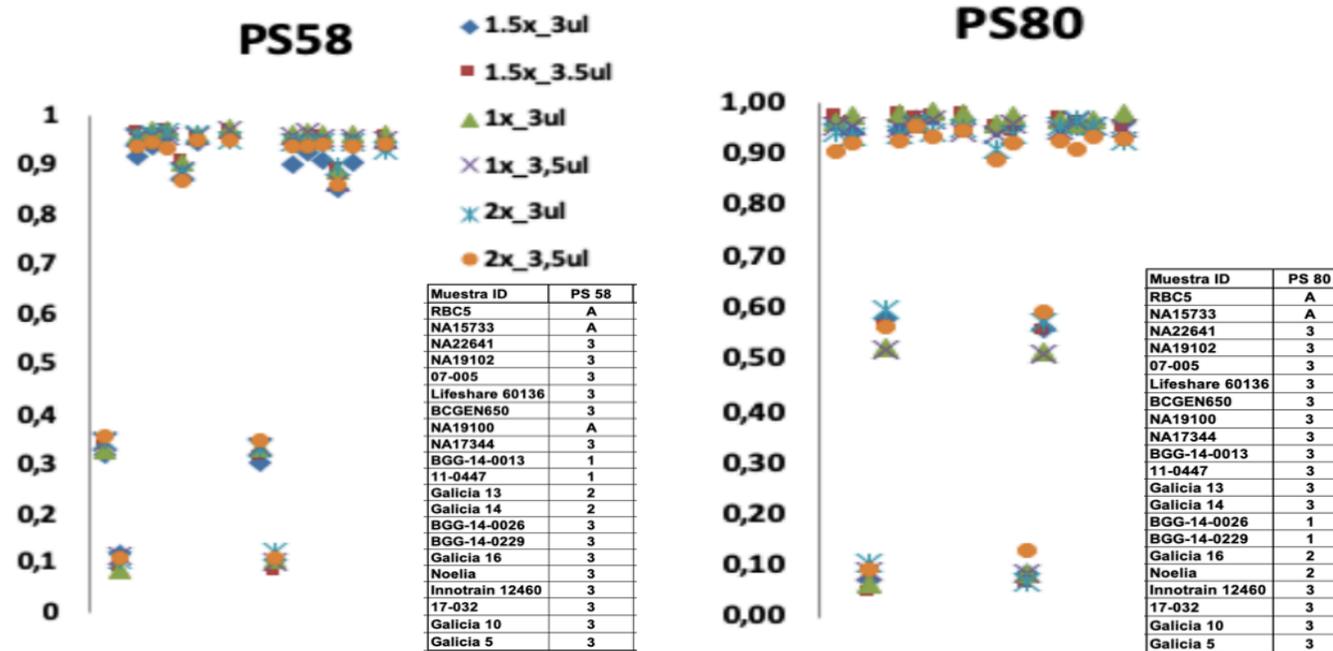


Figura 50 (B). Las representaciones de las discriminaciones de cada uno de los probe sets (PS) testado con cada condición de concentración de biotina y volumen de SAPE. PS58 es el probe set correspondiente al genotipo RHD\*weak D type 1; PS 80 es el probe set correspondiente a genotipo RHD\*weak D type 2. En total 6 condiciones fueron testadas: 1X + 3  $\mu$ L. 1X + 3.5  $\mu$ L. 1.5X + 3  $\mu$ L. 1.5X + 3.5  $\mu$ L. 2X + 3  $\mu$ L y 2X + 3.5  $\mu$ L. En el eje X están representadas las muestras que se testaron, su genotipo de referencia está en la leyenda del gráfico. En el eje Y se muestran los valores que diferencian los tres grupos de genotipos siendo el valor cercano a 1  $\rightarrow$  genotipo 3 (homocigoto normal), el cercano a 0.5  $\rightarrow$  genotipo 2 (heterocigoto) y el cercano a 0  $\rightarrow$  genotipo 1 (homocigoto mutante).

## Resultados

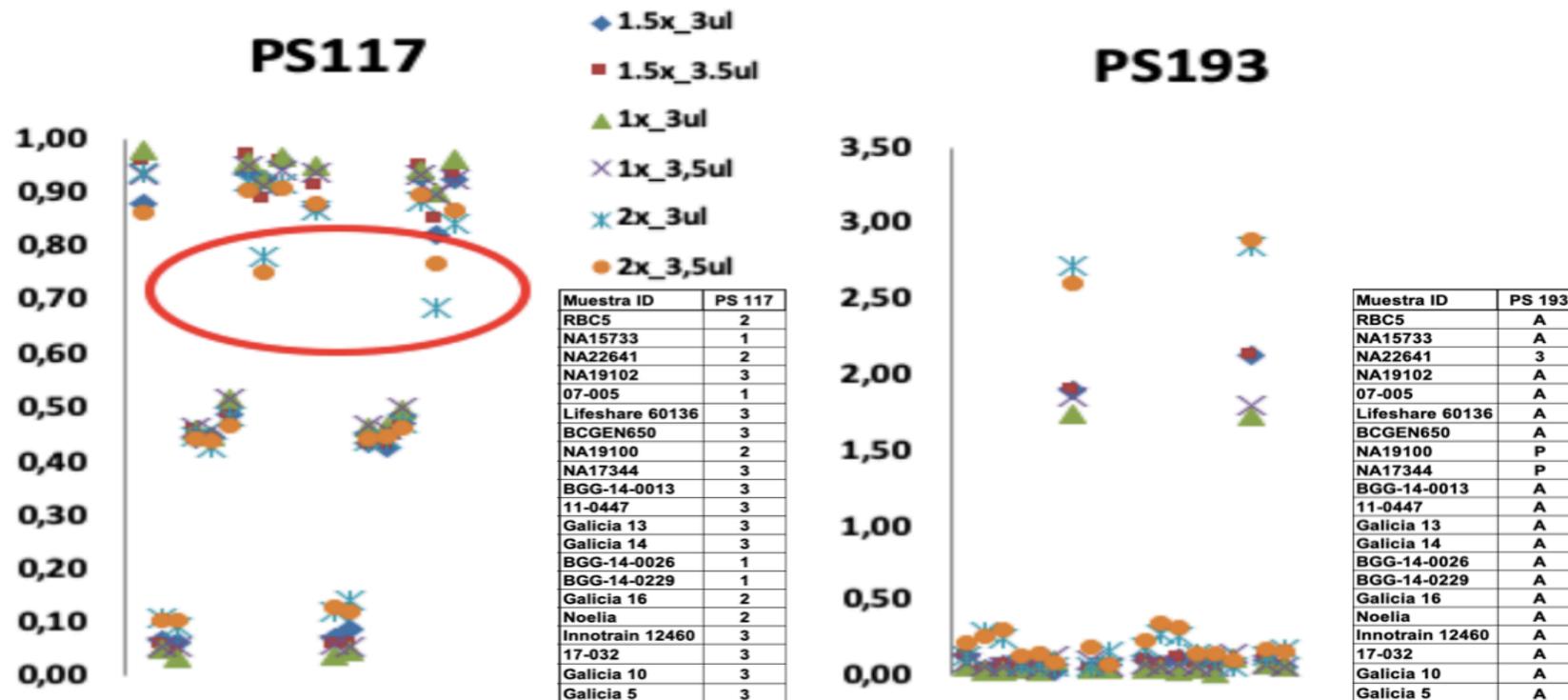


Figura 50 (C). (B). Las representaciones de las discriminaciones de cada uno de los probe sets (PS) testado con cada condición de concentración de biotina y volumen de SAPE. PS117 probe set correspondiente al genotipo de HPA-1 y el PS193 correspondiente al genotipo RHD\*DIIIIA-CE(3-7)-D. En total 6 condiciones fueron testadas: 1X + 3  $\mu$ L. 1X + 3.5  $\mu$ L. 1.5X + 3  $\mu$ L. 1.5X + 3.5  $\mu$ L. 2X + 3  $\mu$ L y 2X + 3.5  $\mu$ L. En el eje X están representadas las muestras que se testaron, su genotipo de referencia está en la leyenda del gráfico. En el eje Y del PS117 se muestran los valores que diferencian los tres grupos de genotipos siendo el valor cercano a 1  $\rightarrow$  genotipo 3 (homocigoto normal), el cercano a 0.5  $\rightarrow$  genotipo 2 (heterocigoto) y el cercano a 0  $\rightarrow$  genotipo 1 (homocigoto mutante). En el eje Y del PS193 se muestran los valores que diferencian los dos grupos de genotipos siendo los valores superiores a 1  $\rightarrow$  genotipo presente y el cercanos a 0  $\rightarrow$  genotipo ausente. En el PS 117 hay un círculo rojo para remarcar como empeora la discriminación con 2X de concentración de Biotina, independientemente de la cantidad de SAPE en el genotipo correspondiente al genotipo 3.

## Resultados

Con estos resultados se definió la concentración del Biotin-11-dCTP en la mix de PCR como 1X y en cuanto al volumen de SAPE en la mix de marcaje se realizó un segundo experimento que consistió en una titulación añadiendo 3, 4 y 5  $\mu\text{L}$  de SAPE al volumen final de 90  $\mu\text{L}$  de la mix y así concretar qué cantidad de SAPE era la óptima [Figura 51 (a), 51 (b) y 51 (c)].

## Resultados

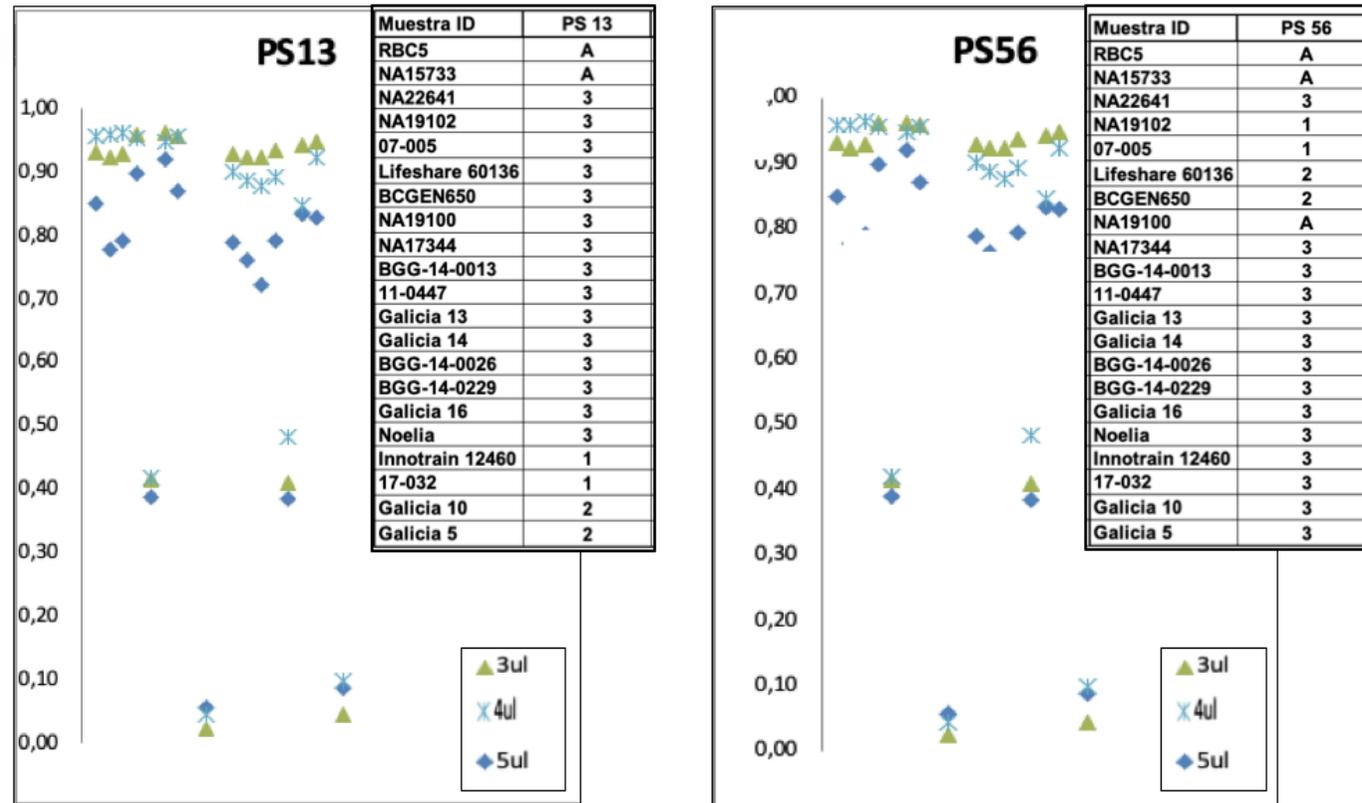


Figura 51 (a). Las representaciones de las discriminaciones de cada uno de los probe sets (PS) testados con 3, 4 y 5  $\mu$ L de SAPE. El PS 13 es el probe set correspondiente a genotipo RHD\*weak D type 3 y PS 56 es el probe set correspondiente al genotipo RHD\*Pseudogene. En el eje X están representadas las muestras que se testaron, su genotipo de referencia está en la leyenda del gráfico. En el eje Y se muestran los valores que diferencian los tres grupos de genotipos, siendo el valor cercano a 1 el genotipo 3 (homocigoto normal), el cercano a 0.5 el genotipo 2 (heterocigoto) y el cercano a 0 el genotipo 1 (homocigoto mutante).

## Resultados

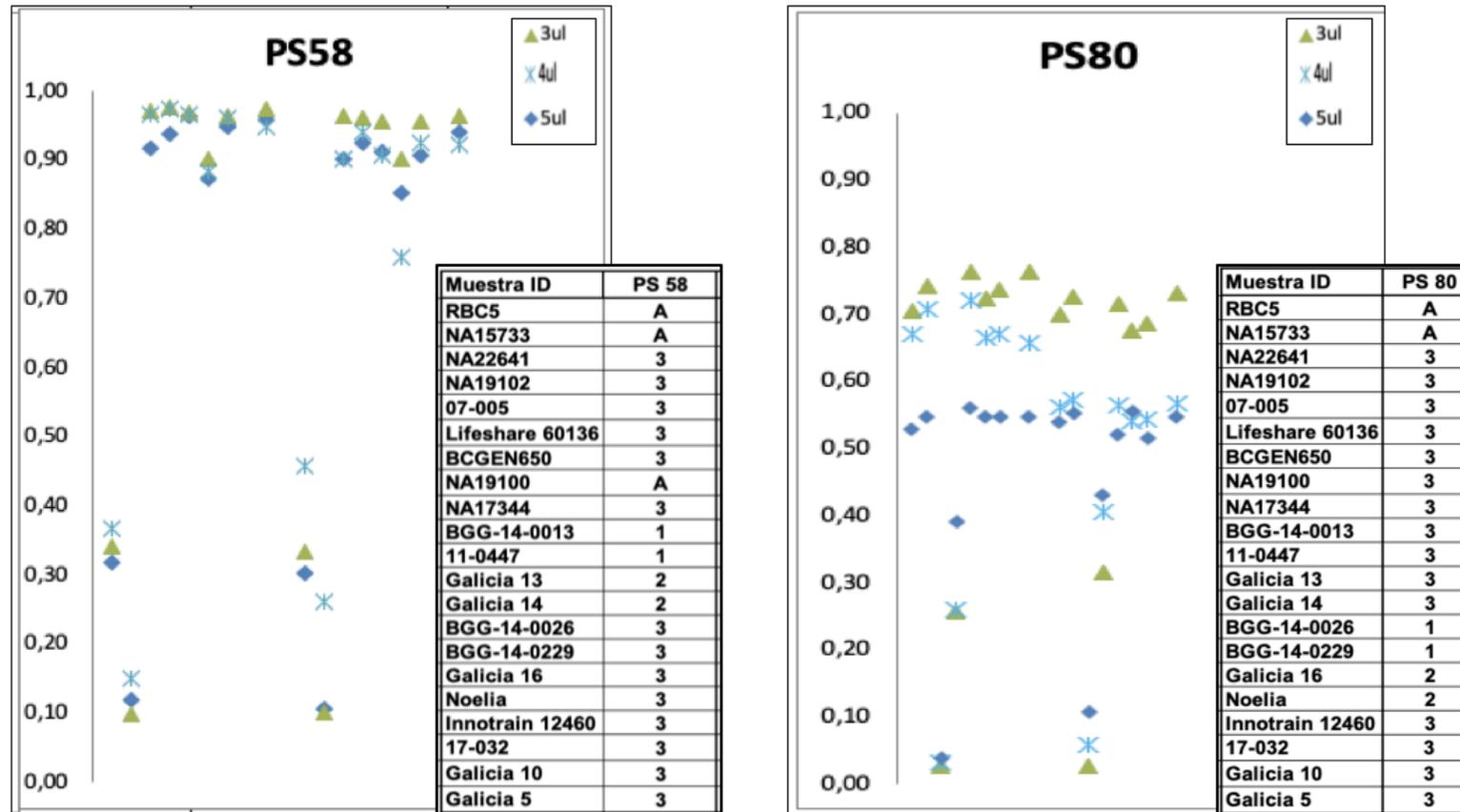


Figura 51 (b). Las representaciones de las discriminaciones de cada uno de los probe sets (PS) testados con 3.4 y 5  $\mu$ L de SAPE. El PS58 es el probe set correspondiente al genotipo RHD\*weak D type 1 y PS 80 es el probe set correspondiente a genotipo RHD\*weak D type 2. En el eje X están representadas las muestras que se testaron, su genotipo de referencia está en la leyenda del gráfico. En el eje Y se muestran los valores que diferencian los tres grupos de genotipos, siendo el valor cercano a 1 el genotipo 3 (homocigoto normal), el cercano a 0.5 el genotipo 2 (heterocigoto) y el cercano a 0 el genotipo 1 (homocigoto mutante).

## Resultados

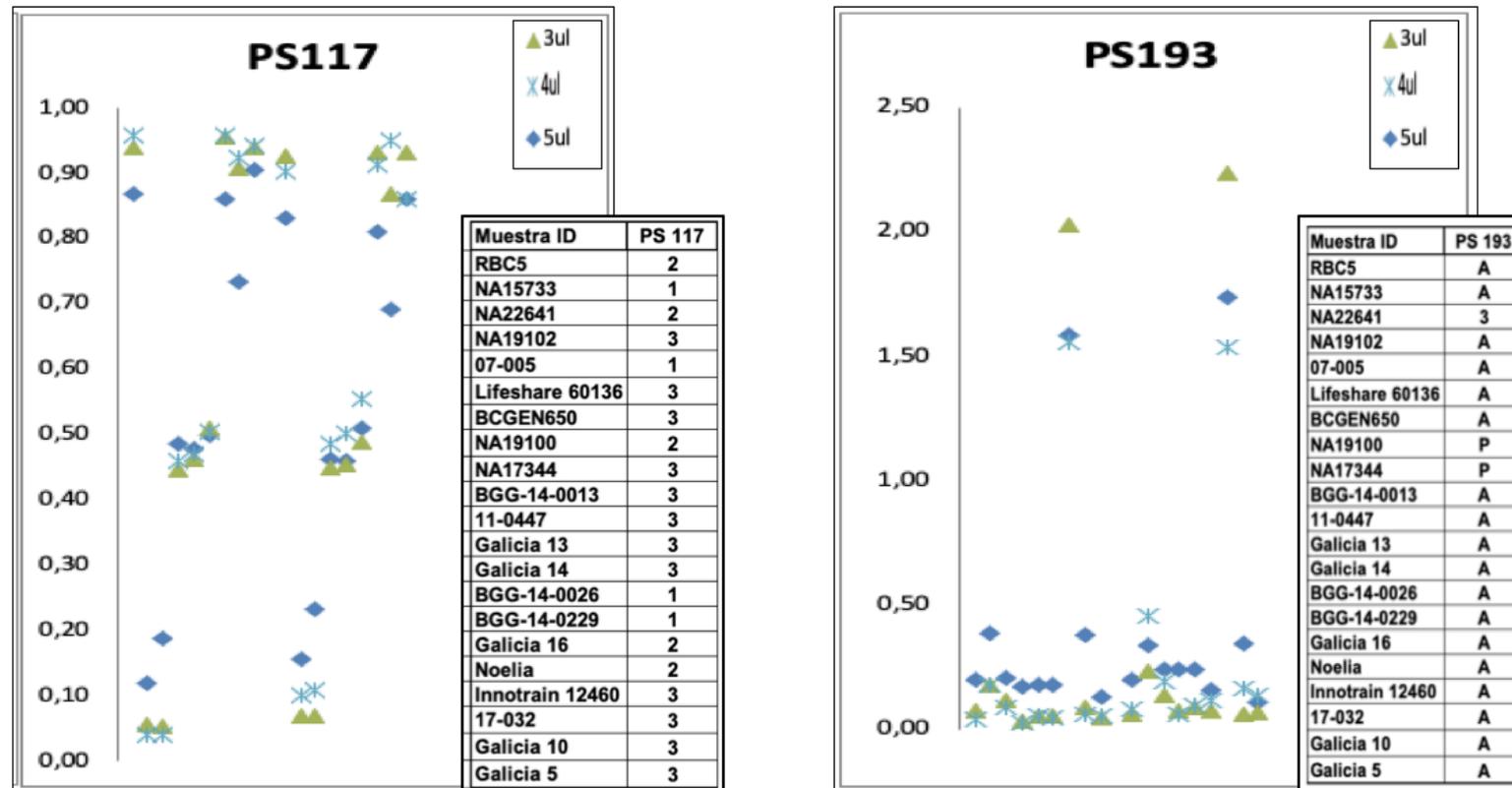


Figura 51 (c). Las representaciones de las discriminaciones de cada uno de los probe sets (PS) testados con 3.4 y 5  $\mu$ L de SAPE. El PS117 probe set correspondiente al genotipo de HPA-1 y el PS193 correspondiente al genotipo RHD\*DIlla-CE(3-7)-D. En el eje X están representadas las muestras que se testaron, su genotipo de referencia está en la leyenda del gráfico. En el eje Y del PS117 se muestran los valores que diferencian los tres grupos de genotipos, siendo el valor cercano a 1 el genotipo 3 (homocigoto normal), el cercano a 0.5 el genotipo 2 (heterocigoto) y el cercano a 0 el genotipo 1 (homocigoto mutante). En el eje Y del PS193 se muestran los valores que diferencian los dos grupos de genotipos siendo los valores superiores a 1  $\rightarrow$  genotipo presente y el cercanos a 0  $\rightarrow$  genotipo ausente.

## Resultados

Los gráficos de la Figura 51 (a) muestran como la discriminación, en general, empeora según se aumentaba la cantidad de SAPE en la mix de marcaje, este efecto se ve en mayor o menor medida en todos los PS.

Por ejemplo, en todos los PS menos el PS58, el genotipo 3 (homocigoto normal), que son los valores cercanos a 1, la dispersión aumenta según se añade más cantidad de SAPE, al igual que en el PS193 donde los valores cercanos a 0, que son lo determinan el genotipo ausente, muestran ese empeoramiento en la discriminación y los ratios son más dispersos, y por tanto, la distancia existente entre las muestras ausentes y presentes era menor.

Con estos resultados el volumen de SAPE definido para añadir a la mix de marcaje fue 3  $\mu$ L.

---

### 1.4 Optimización del programa de PCR según el modelo de termociclador

Se compararon los resultados obtenidos en cada uno de los tres termocicladores: 1.- termociclador Gold plated 96-Well Geneamp® PCR System 9700 (4314878G). 2.-Aluminum-plated 96-Well Geneamp® PCR System 9700 (4314879G) o 3.- Veriti® 96-Well termociclador (4375786 o4452300). Los resultados del termociclador Gold se utilizaron de referencia ya que fue el único que no permite ajustar los modos, ni las rampas del termociclador. Este termociclador se utilizó como de referencia porque ID RHD XT forma parte de una familia de tests de genotipado sanguíneo (ID HPA XT. ID CORE XT) y estos otros ensayos usan este termociclador por lo que el enfoque fue que todos los ensayos utilizarasen los mismos equipos. El termociclador Gold presenta un termobloque de un material distinto respecto al Veriti® y al Aluminum, que permite una transmisión del calor entre los pocillos más uniforme.

Si se observan la Figura 52 (a). (b). (c), los resultados de discriminación en las muestras cuya PCR se realizó con el termociclador Aluminum y Veriti® muestra una mayor variabilidad entre las réplicas porque los valores de MFI son bajos y, por tanto, la discriminación entre los genotipos empeora. Un ejemplo de este empeoramiento en la discriminación ocurre en el PS80 donde se ve una dispersión en las muestras con los termocicladores Veriti y Aluminum respecto al Gold [Figura 52 (b)], otro ejemplo es el PS193, donde las muestras cuyo genotipo era presente disminuyen tanto su señal que hace que la discriminación empeore hasta un nivel en el que no es posible genotiparlas correctamente [Rectángulo rojo en la Figura 52 (c)].

## Resultados

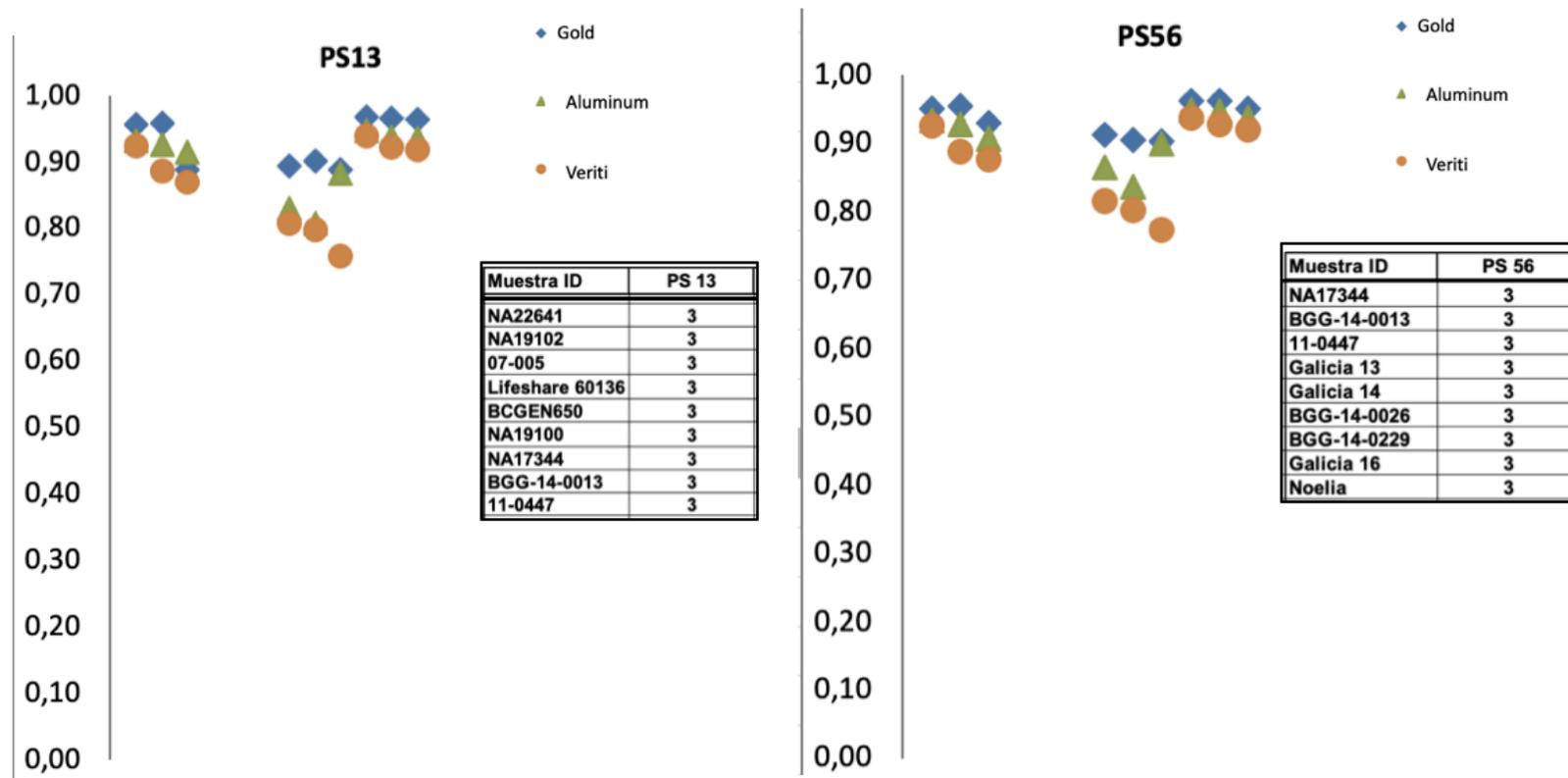


Figura 52 (a). Las representaciones de las discriminaciones de cada uno de los probe sets (PS) testados en cada uno de los distintos modelos de termocicladores (Gold, Aluminum y Veriti). PS 13 es el probe set correspondiente a genotipo RHD\*weak D type 3 y PS 56 es el probe set correspondiente al genotipo RHD\*Pseudogene. En el eje X están representadas las muestras que se testaron, su genotipo de referencia está en la leyenda del gráfico. En el eje Y se muestran los valores que diferencian los tres grupos de genotipos siendo el valor cercano a 1 el genotipo 3 (homocigoto normal), el cercano a 0.5 el genotipo 2 (heterocigoto) y el cercano a 0 el genotipo 1 (homocigoto mutante).

## Resultados

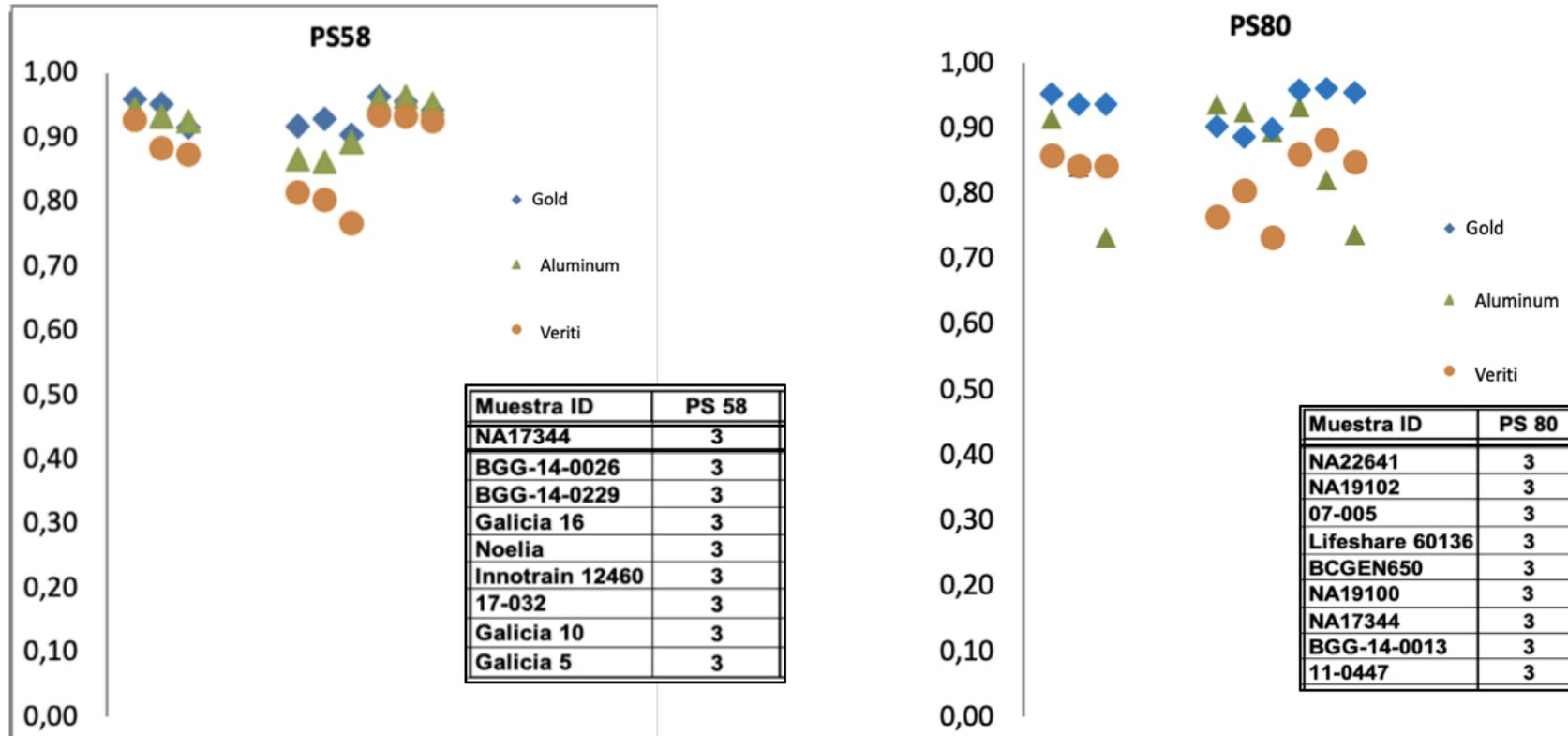


Figura 52 (b). Las representaciones de las discriminaciones de cada uno de los probe sets (PS) testados en cada uno de los distintos modelos de termocicladores (Gold, Aluminum y Veriti). PS58 es el probe set correspondiente al genotipo RHD\*weak D type 1 y PS 80 es el probe set correspondiente a genotipo RHD\*weak D type 2. En el eje X están representadas las muestras que se testaron, su genotipo de referencia está en la leyenda del gráfico. En el eje Y se muestran los valores que diferencian los tres grupos de genotipos siendo el valor cercano a 1 el genotipo 3 (homocigoto normal), el cercano a 0.5 el genotipo 2 (heterocigoto) y el cercano a 0 el genotipo 1 (homocigoto mutante). El PS80 aumenta la dispersión en las muestras amplificadas con los termocicladores Veriti y Aluminum.

## Resultados

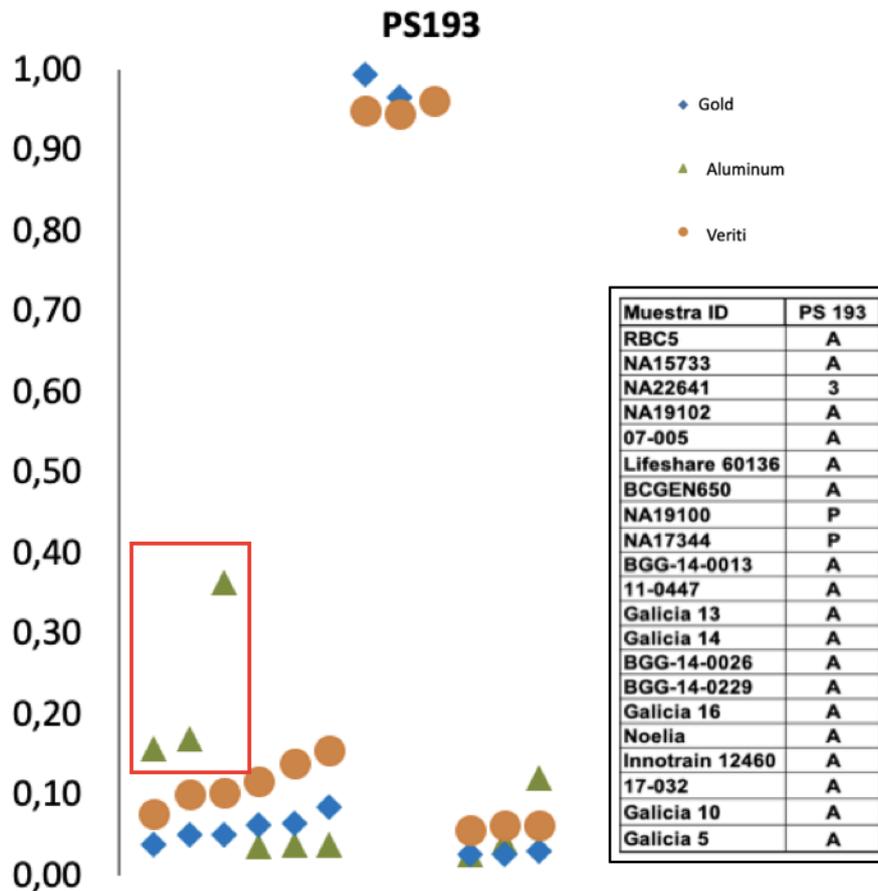


Figura 52 (c). Las representaciones de las discriminaciones de cada uno de los probe sets (PS) testados en cada uno de los distintos modelos de termocicladores (Gold, Aluminum y Veriti). PS193 correspondiente al genotipo RHD\*DIIIa-CE(3-7)-D. En el eje X están representadas las muestras que se testaron, su genotipo de referencia está en la leyenda del gráfico. Y En el eje Y del PS193 se muestran los valores que diferencian los dos grupos de genotipos siendo los valores superiores a 1 →genotipo presente y el cercanos a 0 →genotipo ausente. El PS 193 las muestras cuyo genotipo es presente y fueron amplificadas con el Aluminum disminuyen su señal lo que conlleva a un resultado de genotipo incorrecto (rectángulo rojo en Figura).

Las MFIs también se analizaron y se observó (Tabla 40) que las señales obtenidas con el termociclador Aluminum en las sondas que hibridan fue del 28% (menos) respecto al termociclador Gold plated 96-Well Geneamp®, lo que explica el empeoramiento en general en la discriminación. En el caso del termociclador Veriti® 96-Well los ratios no se vieron afectados y la discriminación en todos los genotipos fue similar a la referencia, la discriminación. En el caso del termociclador Veriti® 96-Well los ratios no se vieron afectados y la discriminación en todos los genotipos fue similar a la referencia.

## Resultados

Tabla 40. Tabla que muestra el % de señal respecto al termociclador Gold de las sondas que hibridan o no en muestras procesadas con los termocicladores Aluminum y Veriti.

<b>Sondas hibridadas</b>	<b>% versus Gold</b>	
	<b>Termociclador</b>	
	<b>Aluminum</b>	<b>Veriti®</b>
<b>Si</b>	-28	+ 2
<b>No</b>	-22	+15

Con estos resultados se decidió realizar un segundo experimento modificando las condiciones de los termocicladores e intentar mejorar estos resultados, para ello en el Aluminum y en Veriti que comparten en mismo material en el termobloque, es decir, la temperatura se transmite de manera similar, se ajustaron sus rampas. Para ello, las rampas se ajustaron al 70% lo que significa que el termociclador calienta y enfría al 70% de la tasa media máxima, necesario para asemejar la forma en la que calientan y enfrían ambos bloques comparados con el termociclador Gold.

Los resultados obtenidos se observan en las graficas de la Figura 53 (a). (b) y (c), donde se puede observar que en el PS13 y PS80 la discriminación entre los 3 genotipos es igual en los 3 termocicladores.

En el PS56 el genotipo heterocigoto (valores cercanos a 0.5) ligeramente mejoran con los termocicladores Aluminio y Gold. En el genotipo homocigoto variante (valores cercanos a 0) la discriminación al final de la placa empeora ligeramente en los 3 termocicladores (ver círculo rojo en PS56). Veriti >Gold >Aluminio este es el orden de mejor a peor discriminación.

En el PS58 la discriminación es similar en todos los termocicladores, aunque Aluminio y Gold empeoran respecto a Veriti pero muy poco.

En el PS117 la discriminación con los 3 termocicladores en todos los genotipos fue similar, pero sí que hubo una muestra (ver círculo rojo en PS117) en todos los termocicladores, cuya discriminación es claramente peor. Esta muestra fue usada previamente en otros experimentos, así que a la vista de los resultados se atribuyó a un error de pipeteo en alguno de los pasos ya sea dispensación del volumen de ADN en la PCR, o en la hibridación del producto amplificado, o dispensación menor durante el marcaje en el termociclador de la mix de SAPE-SAPE dilution buffer.

## Resultados

Y, por último, para el PS193, la discriminación en las muestras presentes, es decir, las muestras cuyo genotipo es RHD\*DIIIa-CE(3-7)-D, fue (de mejor a peor): Aluminium > Veriti > Gold (valores a partir de 0.7).

El **PS193** fue uno de los PS donde más diferencias se encontraron entre los 3 termocicladores pero a pesar de los resultados (Figura 53c) las muestras genotiparon correctamente y la distancia de los ratios entre el valor menor de una muestra presente, y el valor mayor de una ausente estuvo lejos de dar resultado incorrecto (es decir, que una muestra presente genotipara incorrectamente como ausente (falso negativo) y viceversa (falso positivo)).

## Resultados

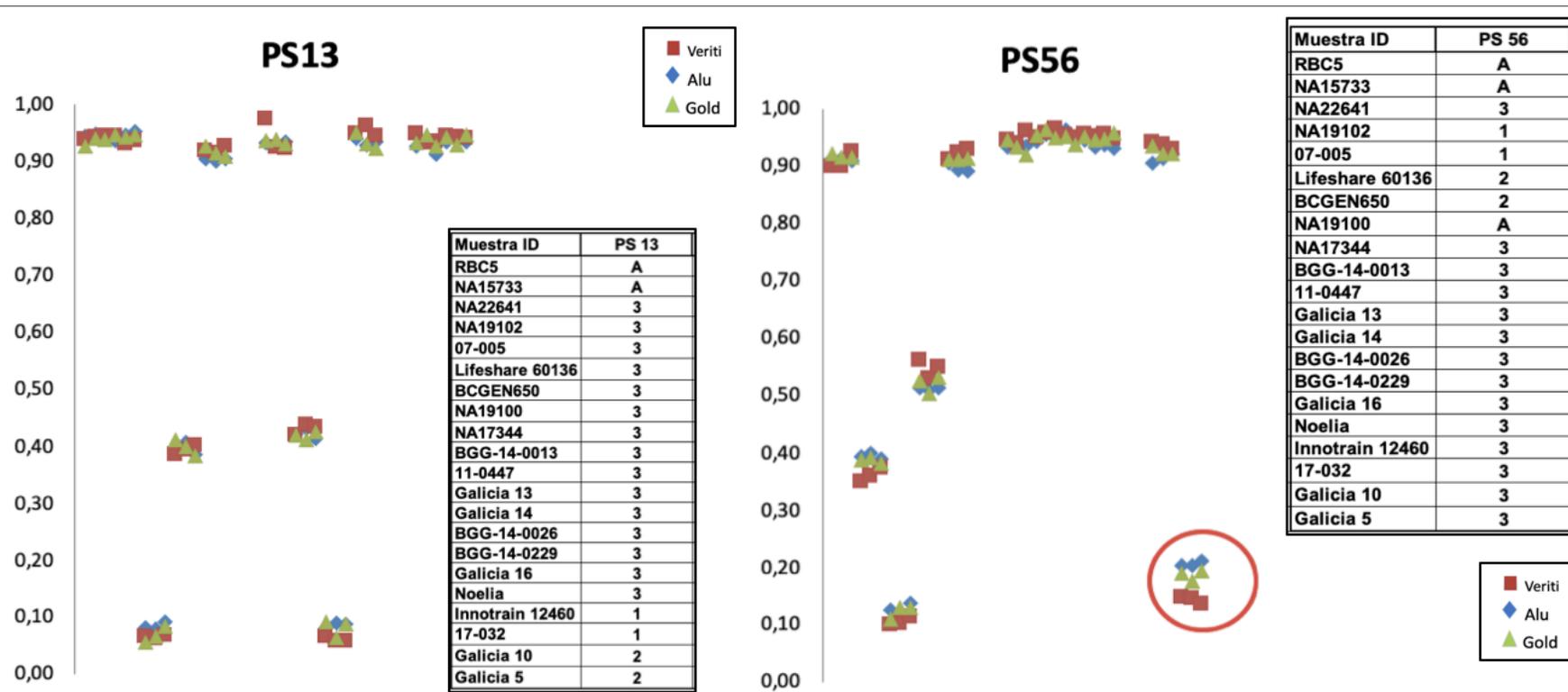


Figura 53 (a). Las representaciones de las discriminaciones de cada uno de los probe sets (PS) testados en cada uno de los distintos modelos de termocicladores (Gold, Aluminum y Veriti) después de ajustar las rampas al 70% en los termocicladores. Veriti y Aluminio. PS 13 es el probe set correspondiente a genotipo RHD\*weak D type 3 y PS 56 es el probe set correspondiente al genotipo RHD\*Pseudogene. En el eje X están representadas las muestras que se testaron, su genotipo de referencia está en la leyenda del gráfico. En el eje Y se muestran los valores que diferencian los tres grupos de genotipos siendo el valor cercano a 1 para el genotipo 3 (homocigoto normal), el cercano a 0.5 para el genotipo 2 (heterocigoto) y el cercano a 0 para el genotipo 1 (homocigoto mutante). En el PS56 el genotipo homocigoto variante (valores cercanos a 0) la discriminación al final de la placa empeora ligeramente en los 3 termocicladores (ver círculo rojo en PS56).

## Resultados

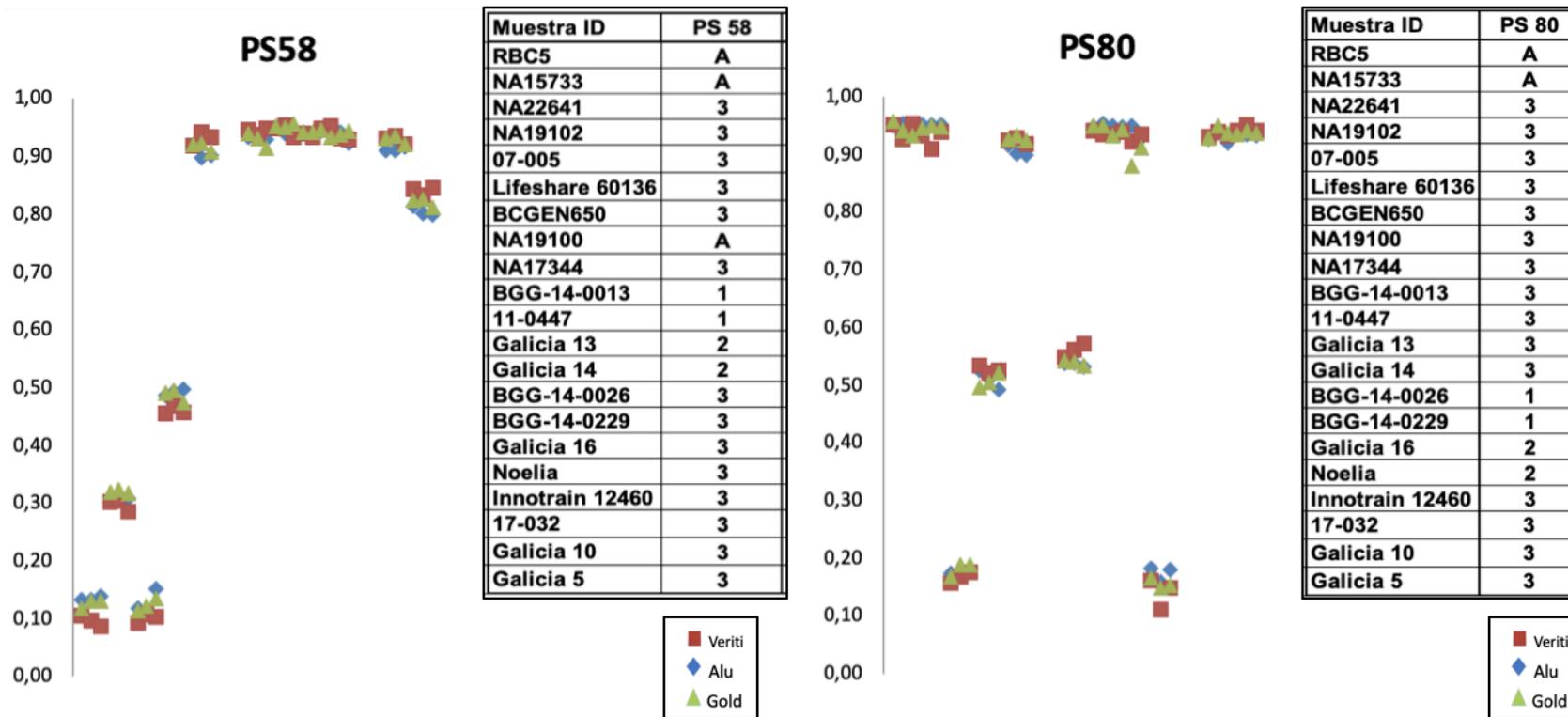


Figura 53 (b). Las representaciones de las discriminaciones de cada uno de los probe sets (PS) testados en cada uno de los distintos modelos de termocicladores (Gold, Aluminio y Veriti) después de ajustar las rampas al 70% en los termocicladores Veriti y Aluminio. PS58 es el probe set correspondiente al genotipo RHD\*weak D type 1 y PS 80 es el probe set. En el eje X están representadas las muestras que se testaron, su genotipo de referencia está en la leyenda del gráfico. En el eje Y se muestran los valores que diferencian los tres grupos de genotipos siendo el valor cercano a 1 para el genotipo 3 (homocigoto normal), el cercano a 0.5 para el genotipo 2 (heterocigoto) y el cercano a 0 para el genotipo 1 (homocigoto mutante).

## Resultados

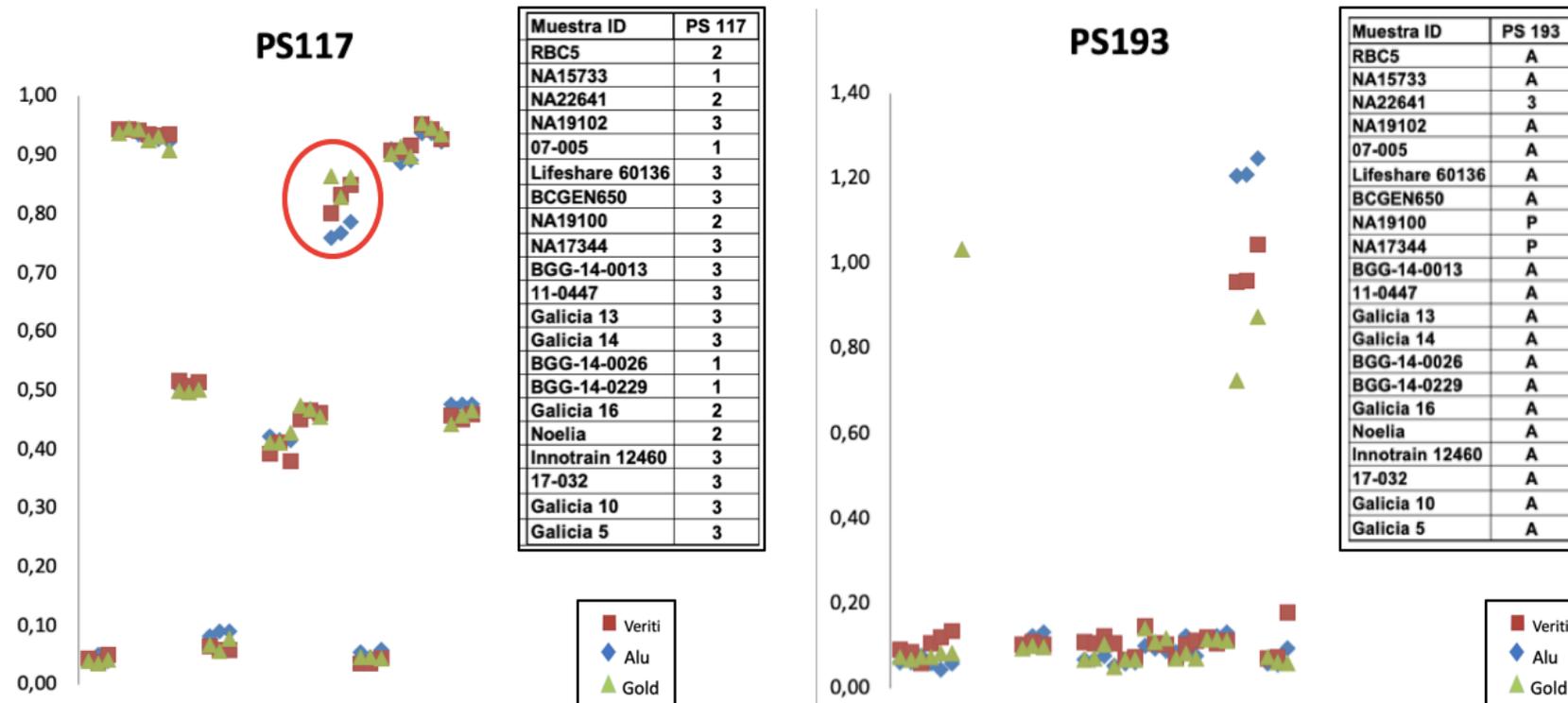


Figura 53 (c). Las representaciones de las discriminaciones de cada uno de los probe sets (PS) testados en cada uno de los distintos modelos de termocicladores (Gold, Aluminio y Veriti) después de ajustar las rampas al 70% en los termocicladores Veriti y Aluminio. PS117 probe set correspondiente al genotipo de *HPA-1* y el PS193 correspondiente al genotipo *RHD\*DIlla-CE(3-7)-D*. En el eje X están representadas las muestras que se testaron, su genotipo de referencia está en la leyenda del gráfico. En el eje Y se muestran los valores que diferencian los tres grupos de genotipos siendo el valor cercano a 1 para el genotipo 3 (homocigoto normal), el cercano a 0.5 para el genotipo 2 (heterocigoto) y el cercano a 0 para el genotipo 1 (homocigoto mutante). Y En el eje Y del PS193 se muestran los valores que diferencian los dos grupos de genotipos siendo los valores superiores a 1 → genotipo presente y el cercanos a 0 → genotipo ausente. En el PS117 hubo una muestra (circulo rojo) en todos los termocicladores, cuya discriminación es claramente peor.

## Resultados

Se concluyó que los tres termocicladores eran capaces de proporcionar una señal y discriminación equivalente siempre y cuando el termociclador Veriti y Aluminium trabajaran con rampas al 70%.

Se concluyó que los tres termocicladores eran capaces de proporcionar una señal y discriminación equivalente siempre y cuando el termociclador Veriti y Aluminium trabajaran con rampas al 70%.

---

### 1.5 Protocolo de conjugados o couplings

Los conjugados son el resultado del proceso de unión del grupo amino primario en el extremo 5', al grupo carboxilo de la bead, que es activado mediante tratamiento con EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride).

A la hora de optimizar el protocolo de conjugados, procedimos inicialmente como muestra la Figura 42 (a) y (b) con 4 probe sets (PS13, 56, 58 y 117) y comparamos la discriminación entre el protocolo de 500  $\mu$ L y el de 1 mL. No testamos volúmenes menores de 500  $\mu$ L ya que existe un riesgo en el conteo mínimo que le pedimos al conjugado cuando se realiza su control de calidad. Es decir, los viales stock de las beads son de 1 mL, en el caso de conjugados de 500  $\mu$ L con un mismo vial se pueden fabricar dos conjugados distintos. Después de muchas fabricaciones de conjugados en una de ellas, cuando se realizó el segundo conjugado con un vial previamente usado tuvimos problemas en el conteo de beads y detectamos que se debió a un problema en la homogenización del vial stock. Ante esta problemática se descartó el uso de volúmenes inferiores.

Si se observa la Figura 54, se ve que en los 4 PS con el protocolo de 1 mL empeoran ligeramente la discriminación de sus ratios, haciendo que la distancia entre los 3 genotipos sea menor. Este movimiento de los ratios está correlacionado con que los valores de MFI obtenidos que fueron menores con el protocolo de 1 mL, entre un 20-30% inferiores. La señal mejoró modulando la cantidad de SAPE a 3  $\mu$ L. [como se explica en el apartado 1.3 Optimización del Biotin-11-dCTP y volumen de SAPE (Protocolo de marcaje)] donde se testaron 3, 4 y 5  $\mu$ L.

## Resultados

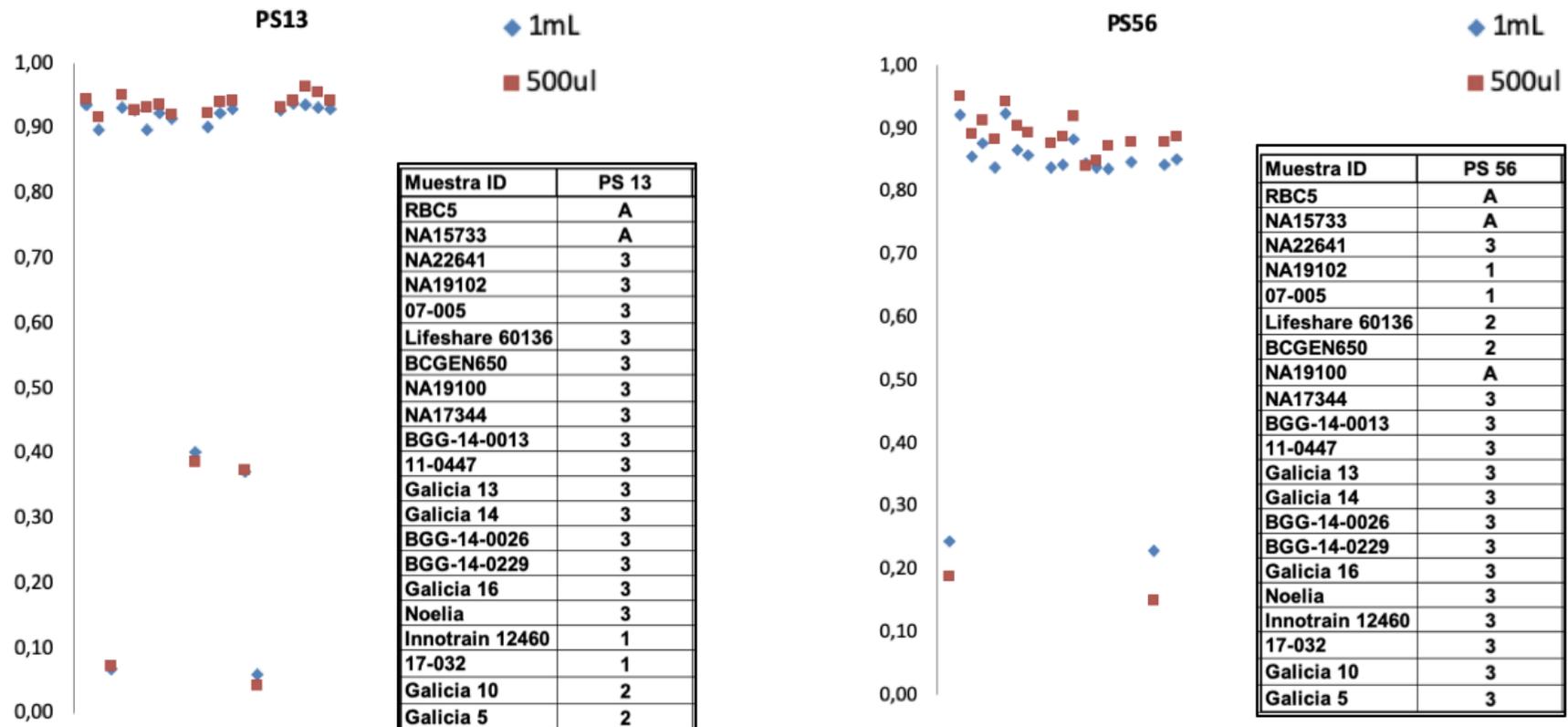


Figura 54 (a). La Figura muestra los conjugados realizados siguiendo el protocolo de 500  $\mu$ L vs 1 mL de partida de volumen de beads. PS 13 es el probe set correspondiente a genotipo RHD\*weak D type 3 y PS 56 es el probe set correspondiente al genotipo RHD\*Pseudogene. En el eje X están representadas las muestras que se testaron, su genotipo de referencia está en la leyenda del gráfico. En el eje Y se muestran los valores que diferencian los tres grupos de genotipos siendo el valor cercano a 1 para el genotipo 3 (homocigoto normal), el cercano a 0.5 para el genotipo 2 (heterocigoto) y el cercano a 0 para el genotipo 1 (homocigoto mutante). El protocolo de 1 mL empeora ligeramente dependiendo del PS y del genotipo comparado con el protocolo de 500  $\mu$ L.

## Resultados

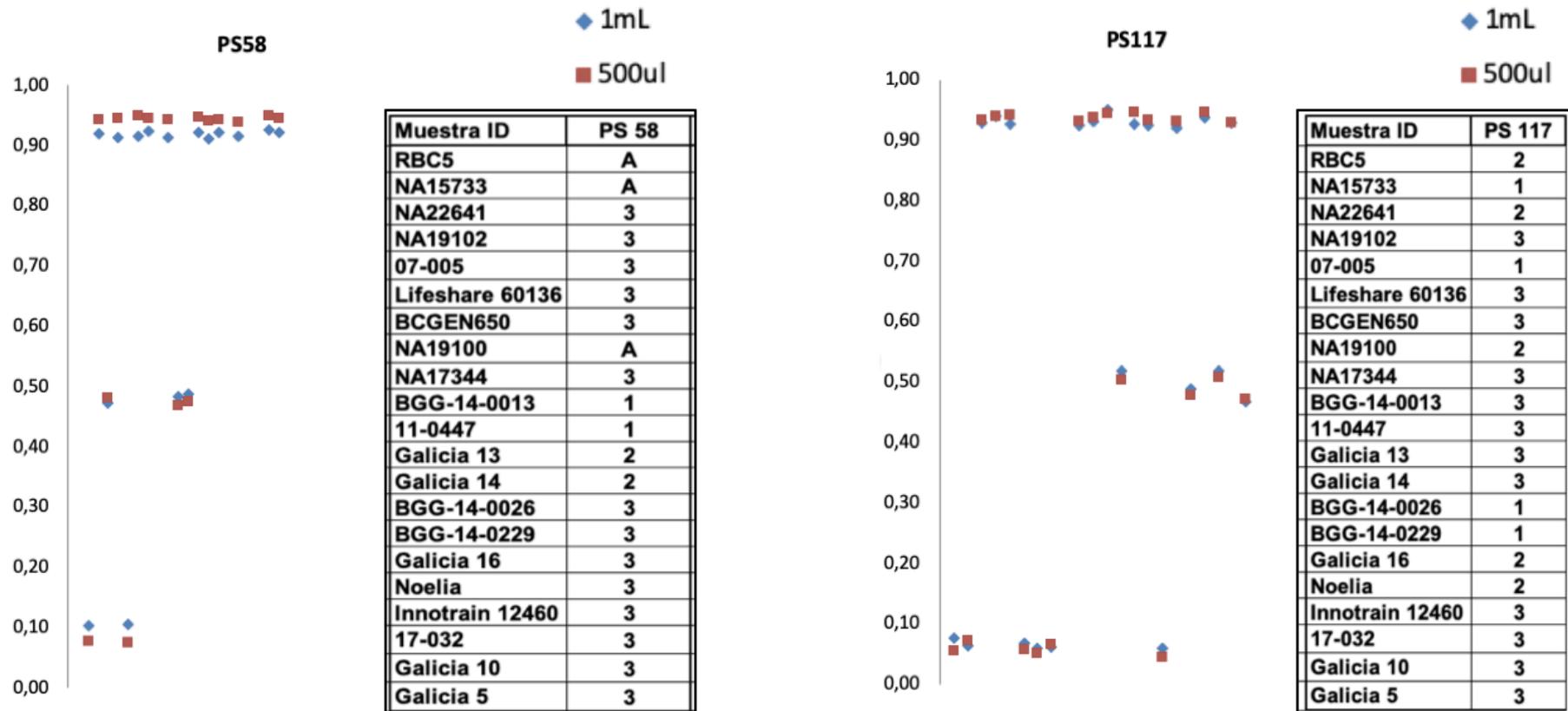


Figura 54 (b). La Figura muestra los conjugados realizados siguiendo el protocolo de 500  $\mu$ L vs 1 mL de partida de volumen de beads. PS58 es el probe set correspondiente al genotipo RHD\*weak D type 1 y PS117 probe set correspondiente al genotipo de HPA-1. En el eje X están representadas las muestras que se testaron, su genotipo de referencia está en la leyenda del gráfico. En el eje Y se muestran los valores que diferencian los tres grupos de genotipos siendo el valor cercano a 1 para el genotipo 3 (homocigoto normal), el cercano a 0.5 para el genotipo 2 (heterocigoto) y el cercano a 0 para el genotipo 1 (homocigoto mutante). El protocolo de 1 mL empeora ligeramente dependiendo del PS y del genotipo comparado con el protocolo de 500  $\mu$ L.

## Resultados

Por otra parte, dentro del protocolo de conjugación, como se explicó en Material y Métodos, un punto crítico fue la adición de EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride), agente activador del grupo carboxilo de la bead para el acoplamiento con el grupo amino en el extremo 5' de las sondas.

Por este motivo, analizamos el efecto del tiempo que se tarda en adicionar el EDC y el posible impacto que podía tener sobre la discriminación en los ratios. Como el tiempo está directamente relacionado con el número de conjugados por tanda, se determinó realizar dos tandas de conjugados, la primera tanda conformada por 8 conjugados y la segunda por 6 conjugados (total 14 conjugados). Además, también se determinó, el tiempo máximo de adición del EDC dentro de cada a tanda, es decir, el tiempo máximo contabilizado desde la adición del EDC al primer tubo hasta el último, tiempo que no debía superar los 3 minutos. Este tiempo se tuvo que registrar en cada tanda y se usó como un parámetro de control del proceso.

El tiempo en adicionar el EDC está ligado con el número, y consecuentemente, con el orden de procesamiento de tubos, es decir, a mayor número de tubos, más tiempo se tarda en añadir el EDC, con lo que se tarda más tiempo en adicionar el EDC al tubo número 14 que al 5. Así, los resultados obtenidos (Figura 55) muestran que según en qué número de posición se realice el conjugado (bead + sonda) la discriminación empeora. Cada probe set (PS) está formado por dos conjugados, cada uno unido a una bead y una sonda diferente [el conjugado 1 formado por la secuencia del alelo A (común) y el conjugado 2 por la secuencia del alelo B (alternativo)] y en total tenemos 7 PS (14 conjugados).

Desde la posición 1-2 hasta la 7-8 (posición 1 y 7 corresponden con el conjugado del alelo A y posición 2 y 8 con el conjugado del alelo B) la discriminación entre los genotipos es prácticamente la misma, la diferencia comienza a partir de la posición de 9 en donde los ratios son más variables y la distancia de genotipado entre los grupos se ve reducida. Con estos resultados se concluyó que los 14 conjugados de ID RHD se iban a producir en dos tandas, una de 6 y otra de 8.

## Resultados

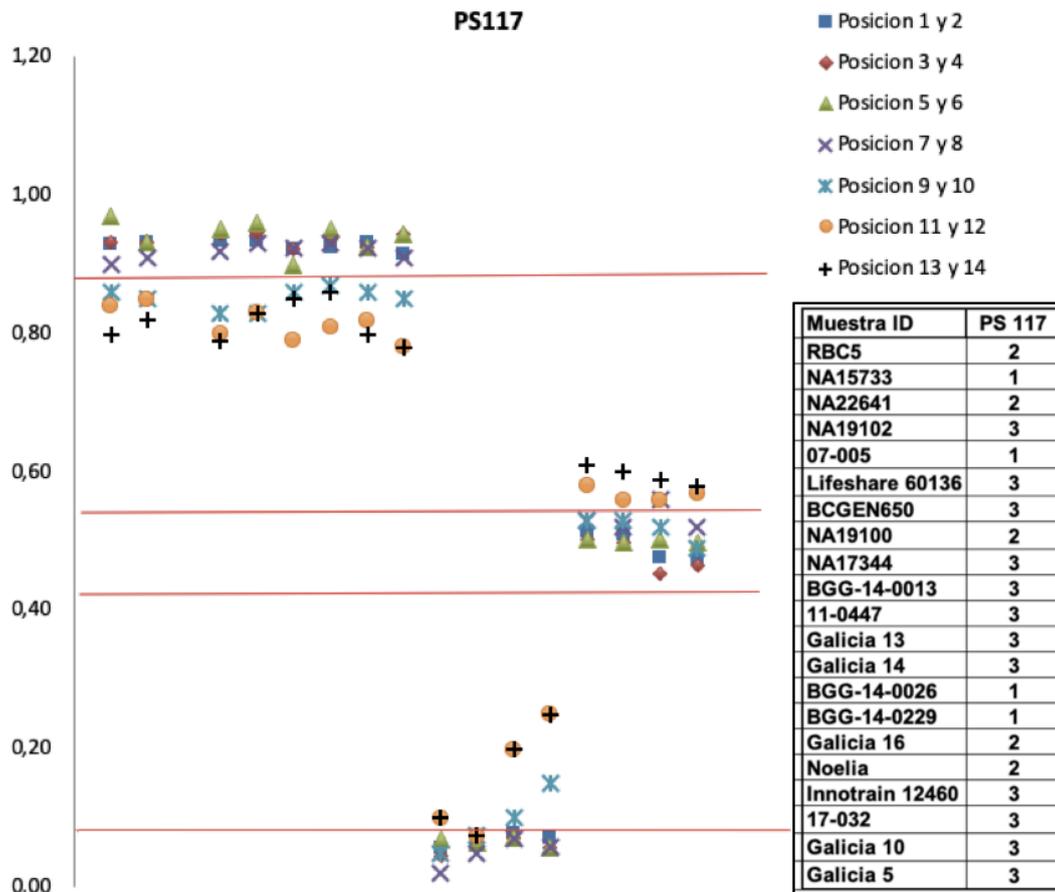


Figura 55. Representación gráfica de la discriminación de los 3 genotipos del PS117 cuando se realiza la conjugación de este mismo PS en cada una de las posiciones en las que se realizan el resto de conjugados de ID RHD XT, es decir, desde la posición 1 hasta la 14. En el eje X están representadas las muestras que se testaron, su genotipo de referencia está en la leyenda del gráfico. En el eje Y se muestran los valores que diferencian los tres grupos de genotipos siendo el valor cercano a 1 para el genotipo 3 (homocigoto normal), el cercano a 0.5 para el genotipo 2 (heterocigoto) y el cercano a 0 para el genotipo 1 (homocigoto mutante). Siempre las posiciones van en pareja, ejemplo, posición 1 y 2 porque los conjugados se realizan de dos en dos (un conjugado pertenece a la sonda alelo normal o frecuente y la otra sonda al alelo variante). Las líneas rojas están delimitando la zona de los ratios desde la posición 1 a la 8, posiciones máximas elegidas para producir los conjugados.

Otro parámetro que se evaluó en la optimización del protocolo de conjugación fue el efecto de usar EDC alícuotado y de un único uso, respecto a un stock (de EDC) sobre el que se realizan varias aperturas. En el protocolo se denominó como "único uso" al EDC ya alícuotado.

## Resultados

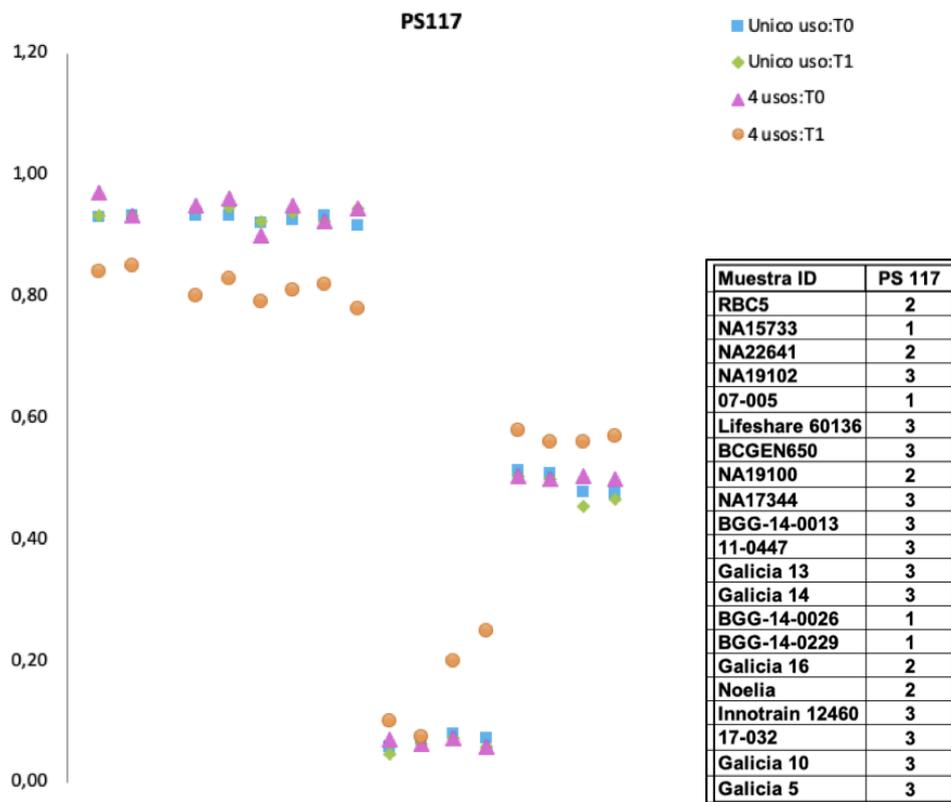


Figura 56. Representación gráfica de la discriminación de los 3 genotipos del PS117 cuando se realiza la conjugación de este mismo PS utilizando el reactivo EDC de único uso versus 4 aperturas del vial stock. En la gráfica aparecen 4 condiciones: Único uso T0; Único uso T1; 4 usos T0 y; 4 usos T1. El T1 equivale 1 mes durante en cual se realizaron 4 aperturas del EDC. En el eje X están representadas las muestras que se testaron, su genotipo de referencia está en la leyenda del gráfico. En el eje Y se muestran los valores que diferencian los tres grupos de genotipos siendo el valor cercano a 1 para el genotipo 3 (homocigoto normal), el cercano a 0.5 para el genotipo 2 (heterocigoto) y el cercano a 0 para el genotipo 1 (homocigoto mutante). Los puntos que corresponden con 4 usos: T1 su discriminación es peor que respecto a los a T1 único uso.

Como muestra la Figura 56 ambas condiciones (único uso y 4 usos) fueron analizadas a dos tiempos. Los dos tiempos fueron, en primer lugar, el T0 en donde ambas condiciones son iguales, tiempo utilizado como referencia, y al de un mes (T1), tiempo durante el cual se realizaron 4 aperturas del vial stock (una por semana). En la última apertura se realizaron los conjugados del PS117.

El primer tiempo es el T0, es decir, la primera apertura del reactivo. Los resultados muestran cómo ambos reactivos se comportan igual y la discriminación no se ve afectada. La diferencia se observa a tiempo un mes (T1), después de las 4 aperturas realizadas al vial stock, en donde se ve un claro empeoramiento en los ratios haciendo que los 3 genotipos se vean afectados respecto al vial también almacenado durante T1 pero sin haber sido abierto.

## Resultados

Y, por último, se valoró la utilización del uso de buffer MES (buffer esencial para la eficiencia del proceso de acoplamiento sonda-bead mediante el EDC) frente al uso de agua en la resuspensión del EDC (el EDC es un reactivo liofilizado que debe resuspenderser en el momento de su uso). Los resultados correspondientes indicaron que la adición de MES aparentemente no empeoraba ni mejoraba la discriminación (Figura 57).

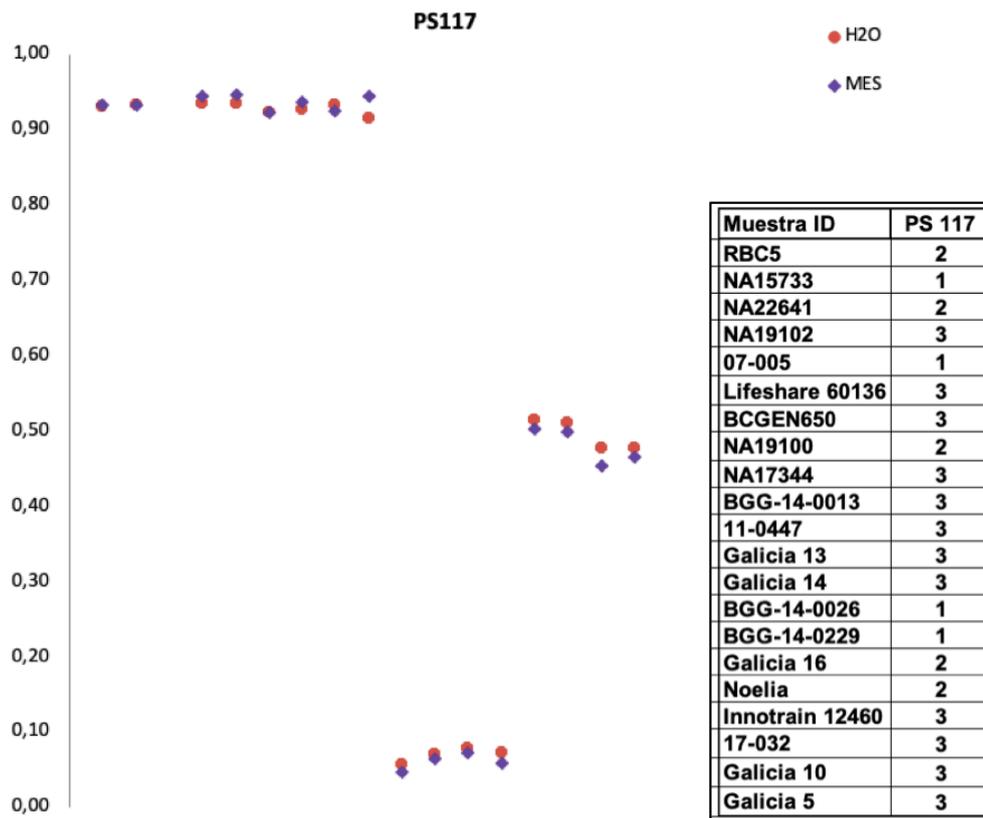


Figura 57. Representación gráfica de la discriminación de los 3 genotipos del PS117 cuando se realiza la conjugación de este mismo PS, resuspendiendo el EDC en agua *versus* Buffer MES. En el eje X están representadas las muestras que se testaron, su genotipo de referencia está en la leyenda del gráfico. En el eje Y se muestran los valores que diferencian los tres grupos de genotipos siendo el valor cercano a 1 para el genotipo 3 (homocigoto normal), el cercano a 0.5 para el genotipo 2 (heterocigoto) y el cercano a 0 para el genotipo 1 (homocigoto mutante).

## Resultados

### 1.6 Análisis de los resultados preliminares

Una vez optimizadas las condiciones relacionadas con el diseño del test, anteriormente explicadas, procedimos a analizar todos los resultados obtenidos de los distintos ensayos. Todos esos datos sirvieron para realizar una estimación de los rangos de genotipado para cada uno de los clusters. Estos datos son necesarios por parte del equipo de IT para la programación del software de automático de análisis. En la Tabla 41 se detalla los valores de cada uno de los clusters y se explica qué valores se determinaron.

**Tabla 41.** Tabla resumen de los valores obtenidos y necesarios para la programación el software de análisis por parte del equipo de IT. La columna “Ratio Presencia / ausencia” indica la ratio que determina la presencia o ausencia del exón del gen *RHD*. La columna “Cluster o grupo 1, 2 o 3” indica la ratio que determina el genotipo de cada uno de los polimorfismos del test; así el cluster llamado 1 determina los genotipos homocigotos infrecuentes, el cluster 2 los genotipos heterocigotos y el cluster 3 los genotipos homocigotos frecuentes. La columna “Mínima MFI 1 y 2” indica el valor mínimo de cada una de las MFIs (MFI 1 y MFI 2) en cada uno de los clusters (la mínima señal de genotipado correcto en cada cluster para las muestras). Y la columna “Limite inferior y superior” indica los valores mínimos y máximos de ratio en cada uno de los clusters para que genotipen correctamente los 3 grupos (1, 2 y 3).

PS	Ratio	Cluster o Grupo	Cluster o Grupo	Minima MFI 1	Minima MFI 2	Limite inferior	Limite superior
13	≤0,342	A	na				
	≥0,483	P	1	433	na	0,000	0,194
			2	433	440	0,208	0,684
			3	na	440	0,7	1,000
56	≤0,855	A	na				
	≥1,299	P	1	429	na	0,000	0,252
			2	429	517	0,281	0,774
			3	na	517	0,799	1,000
58	≤0,855	A	na				
	≥1,299	P	1	413	na	0,000	0,171
			2	413	433	0,2	0,69
			3	na	433	0,727	1,000
80	≤0,458	A	na				
	≥0,577	P	1	415	na	0,000	0,323
			2	415	695	0,338	0,758
			3	na	695	0,771	1,000
117	na	na	1	348	na	0,000	0,207
			2	348	404	0,226	0,698
			3	na	404	0,726	1,000
193	≤1,610	A	na	na		na	
	≥1,943	P		1319	1207		

### FASE 2: Desarrollo del prototipo

#### 2. Determinación de controles de calidad

##### 2.1. Control de calidad determinados para la PCR Master Mix (PMM) y sus materias intermedias

###### A. Materias intermedias involucradas en la fabricación de la PMM

###### A.1. QIAGEN 10X

La Tabla 42 describe los valores de conductividad de 12 lotes distintos del buffer 10X, analizados en dos conductímetros y los valores de temperatura (°C). La temperatura hay que tenerla en cuenta en las medidas de conductividad ya que los dos factores que influyen en los resultados son: la agitación de la solución cuando se está realizando la medida (nuestras medias siempre se realizaron en agitación) ya que la corriente eléctrica se debe al movimiento de iones en la disolución y el otro factor, es la temperatura que influye en dicho movimiento por lo que se debe realizar a 20-25°C.

Tabla 42. Medidas de conductividades de 12 lotes distintos de buffer 10X. La conductividad se midió en dos conductímetros distintos.

Lote Buffer 10X	Conductímetro	Conductividad (mS/cm)	Temperatura (°C)
1	PGK802D	39.9	25.4
2	PGK802C	39.7	24.6
3	PGK802D	38.9	24.5
4	PGK802C	39.7	25.7
5	PGK802D	39.5	25.4
6	PGK802C	38.9	25.0
7	PGK802D	40.2	23.0
8	PGK802C	40.0	22.9
9	PGK802D	39.3	23.2
10	PGK802C	39.7	22.8
11	PGK802D	39.8	22.7
12	PGK802C	38.7	22.5

No se detectaron valores atípicos y, por lo tanto, todos los datos se utilizaron para establecer las especificaciones de control de calidad. Los valores de conductividad más bajos y más altos obtenidos para el búfer Qiagen 10X fueron 38.70 mS / cm y 40.20 mS / cm.

## Resultados

Estos rangos se ampliaron a 37 - 42 mS / cm para el buffer Qiagen 10x después de considerar el 5% de diferencia en las mediciones entre los dos conductímetros. Este rango se consideró aceptable para definir el QC del buffer Qiagen 10x.

### A.2. DNTPs Y Biotin-11-DCTP

---

Otros dos componentes que forman parte de la receta de la PMM son los dNTPs y el Biotin-11-dCTP. A estos componentes, se les realizaron dos controles de calidad, basados en la medida de su pH y concentración.

#### A.2.1. pH: dNTPS

Los datos de pH proporcionados por el proveedor (tomados a 4°C) para los dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) fueron  $8.5 \pm 0.1$ . Nuestro control de calidad consistió en confirmar que los valores de pH eran correctos. Como el pH sólo lo podíamos medir a temperatura ambiente (RT), a los valores del proveedor se les aplicó una corrección de 0.14, por lo que, tras la corrección, el nuevo rango inferido de pH que hubiera proporcionado el proveedor a RT pasó a ser 8.26 - 8.74

Además, a este rango se le añadió la variabilidad observada en nuestros equipos (la llamada variabilidad de medida), que fue de 0.15. Así el rango establecido para los dNTPs fue 8.1- 8.9. Este rango de pH se confirmó en todos los casos testados, tal y como se muestra en la Tabla 43.

**Tabla 43. Medidas de pH de un lote de cada uno de los 4 dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) cuyo rango se estableció para hacer las medidas a temperatura ambiente.**

Nucleótido	pH	
	Observado	Rango aceptación: 8.1- 8.9
dCTP	8.56	CORRECTO
dATP	8.40	CORRECTO
dTTP	8.45	CORRECTO
dGTP	8.50	CORRECTO

#### A.2.2. pH: BIOTINA-11-dCTP

La medida de pH la utilizamos como indicativo de la validez del reactivo para su uso en la fabricación de la PMM. Si el pH estuviese fuera de el rango establecido ese reactivo lo rechazaríamos porque no cumple con las especificaciones asignadas. Cualquier valor fuera de ese rango podría ser un indicativo de una fabricación incorrecta o el deterioramiento del reactivo

## Resultados

o otras causas desconocidas lo que podría afectar a nuestra PMM y, por tanto, poner en riesgo el genotipado de las muestras.

En el caso de la Biotina-11-dCTP, se midieron 2 lotes distintos de biotina y se confirmó el rango de referencia (establecido por parte del proveedor asumiendo que se hubiera realizado ésta a RT, pH 7.0 – 8.5). Confirmamos que esos dos lotes de biotina cumplen con los criterios de pH establecidos por parte del proveedor (Tabla 44).

Tabla 44. Medidas de pH de 2 lotes de biotina.

Lote	pH	Temperatura (°C)
RK008-031	7,34	21,1
BM007-043	8,06	21,2

### A.2.3. Concentración: dNTPS y BIOTINA-11-dCTP

El siguiente control de calidad establecido fue confirmar la concentración establecida por parte del proveedor tanto de los dNTPs (100 mM) como de la biotina-11-dCTP (1 mM).

De nuevo se confirmaron los datos enviados por parte del proveedor en su Certificado Analítico (CoA) como medida preventiva en la detección de materias primas no aptas para usarlas en la fabricación de los componentes de nuestro test. Realizar estas medidas confirmatorias nos ha permitido detectar errores en materias primas. Un ejemplo fue en la medida de la concentración de unos oligonucleótidos cuyo valor era el doble de la concentración teórica, por lo que fueron rechazados y reclamados al proveedor, quien tras un segundo análisis confirmó un error en la dispensación por parte de su robot a la hora de alicuotar, lo que originó la mezcla de síntesis de distintos oligos.

Los dNTPs diluidos 1/200 se cuantificaron por cuatro operadores para estimar la variabilidad observada entre las diluciones (Tabla 45).

Tabla 45. Medidas de concentración ( $\mu\text{M}$ ) de los dNTPs realizadas en el espectrofotómetro NanoDrop™ 8000 (Thermofisher scientific) por 4 operadores distintos previa dilución 1/200.

Operador	dNTPs			
	dTTP	dCTP	dATP	dGTP
1	499.12	496.25	483.56	483.19
2	498.12	500.20	485.84	480.17
3	493.20	486.34	477.99	463.11
4	518.50	516.84	506.94	495.07

## Resultados

Se midieron los dNTPs diluidos 1/200, así que el rango de medida esperado debía ser 500  $\mu$ M, la diferencia entre el valor mínimo y máximo observado se restó a la concentración teórica esperada. Así el rango establecido fue 445-555  $\mu$ M.

Para la Biotin-11-dCTP no se tuvo que realizar dilución previa así que al valor medido esperado  $1 \pm 0.1$  mM, la diferencia entre el valor mínimo y máximo observado se restó a la concentración teórica esperada. Así los valores establecidos como especificación fueron 860-1140  $\mu$ M.

Establecidos los rangos se cuantificaron los dNTPs y el Biotin-11-dCTP que se utilizaron en la fabricación de los 3 primeros lotes (Tabla 46).

**Tabla 46. Medidas de concentración de cada uno de los dNTPs (previa dilución 1/200) y Biotin-11-dCTP realizadas en el espectrofotómetro NanoDrop™ 8000 (ThermoFisher scientific) que cumple el rango establecido de control de calidad.**

Nucleótido	Concentración ( $\mu$ M)	
	Esperada	Observada
dCTP	455 - 555	522
dATP	455 - 555	530
dTTP	455 - 555	503
dGTP	455 - 555	525
Biotin-11-dCTP	860 - 1140	1113

### A.3. Oligonucleótidos (primers, sondas y antisondas)

En la Tabla están los valores máximos y mínimos de concentración medidos con Nanodrop en 4 lotes distintos de oligos sabiendo que la concentración teórica es de 100  $\mu$ M (Figura 58).

## Resultados

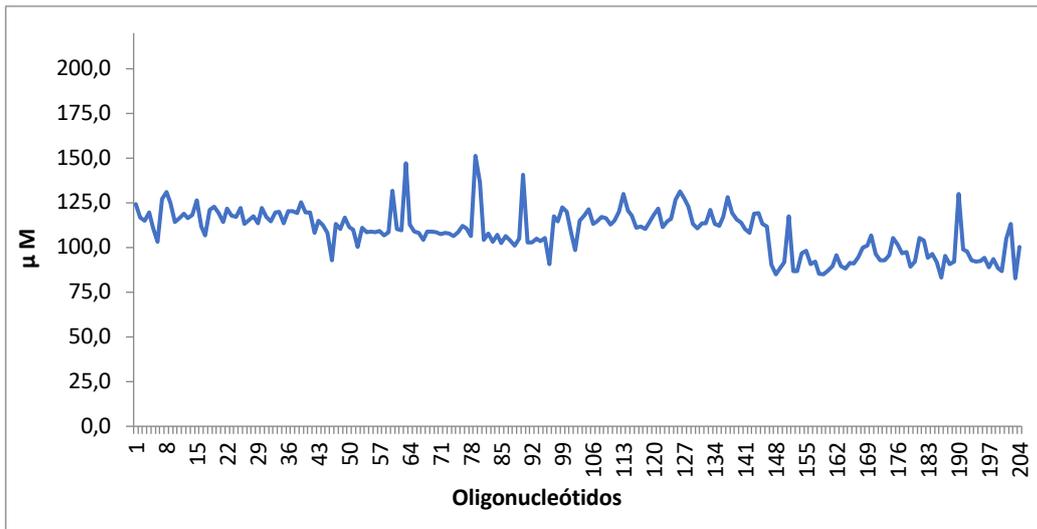


Figura 58. Concentración ( $\mu\text{M}$ ) medida con el Nanodrop para los 204 oligonucleótidos. En el eje Y se representa la concentración ( $\mu\text{M}$ ) medida en el Nanodrop y en el eje X son los 204 oligonucleótidos medidos.

En la Tabla 47 está marcado en verde el valor más alto y más bajo hallado de un total de 4 lotes diferentes de oligonucleótidos, es decir, un total de 204 medidas u oligonucleótidos.

Tabla 47. Medidas de concentración en el espectrofotómetro NanoDrop™ 8000 de 4 lotes distintos de primer, sondas y antisondas. Marcado en verde el valor mínimo (de los mínimos) y máximo (de los máximos) medido.

Concentración ( $\mu\text{M}$ )			
Lote	Minimo	Máximo	Promedio
1	92,9	131	117,1
2	90,9	151	110,7
3	98,5	131	116,5
4	82,8	130	94,9

Para determinar el rango de concentración se analizaron los valores comprendidos entre 131 y 151  $\mu\text{M}$ . Del total de 204 datos; 1 dato dio un valor de 151  $\mu\text{M}$ . 3 datos dieron por encima de 140  $\mu\text{M}$  y 5 datos dieron una concentración de 131  $\mu\text{M}$ . Todos los datos por encima de 131  $\mu\text{M}$  se consideraron outliers o valores atípicos. Por lo tanto, el rango de cuantificación de la concentración de los oligonucleótidos se definió como aquel comprendido entre la concentración teórica (100  $\mu\text{M}$ ) +/- un 30% quedando definido en 70-130  $\mu\text{M}$ . Cualquier oligonucleótido fuera de ese rango se rechazaría como materia prima para la fabricación de los componentes del ensayo ID RHD XT.

## Resultados

### B. PCR Master Mix (PMM)

---

Definidos todos los controles de calidad de las materias intermedias involucradas en la fabricación de la PMM, a continuación, se explica qué control de calidad fue definido para este componente del test ID RHD XT.

Para ello se midieron la conductividad en 24 lotes de PMM y se analizaron en dos conductímetros se describen en la Tabla 48.

**Tabla 48. Medidas de conductividades de 24 fabricaciones distintas de PCR Master Mix (PMM), medidas en dos conductímetros distintos**

Lote PMM	Conductímetro	Conductividad (μS/cm)	Temperatura (°C)
1	PGK802D	684	23.1
2	PGK802C	687	23.1
3	PGK802D	688	23.2
4	PGK802C	694	23.0
5	PGK802D	694	22.9
6	PGK802C	694	22.9
7	PGK802D	685	23.2
8	PGK802C	686	23.2
9	PGK802D	687	23.2
10	PGK802C	687	23.2
11	PGK802D	689	23.2
12	PGK802C	685	23
13	PGK802D	686	22.1
14	PGK802C	682	21.5
15	PGK802D	679	21.4
16	PGK802C	662	22.6
17	PGK802D	650	22.2
18	PGK802C	684	22.0
19	PGK802D	650	21.8
20	PGK802C	658	23.3
21	PGK802D	722	21.5
22	PGK802C	668	21.5
23	PGK802D	626	21.3
24	PGK802C	695	21.4

Se analizaron los datos para establecer el rango de aceptación como se explicó en Material y Métodos, es decir, eliminando los valores atípicos del grupo de datos. En este caso no se

## Resultados

encontraron valores atípicos entre las medidas de las 24 PMM realizadas en ambos conductímetros.

Los valores de conductividad más bajos y más altos obtenidos fueron  $626 \mu\text{S} / \text{cm}$  y  $722 \mu\text{S} / \text{cm}$ , respectivamente. Estas diferencias son debidas a la varibilidad intrínseca al proceso de fabricación por el uso de materias primas distintas. Como todas las PMM funcionalmente resultaron correctas, es decir, cuando se procesaron muestras de genotipo conocido todos los resultados fueron los esperados, concluimos que esos valores de conductividad son válidos. El rango definido, como en anteriores ocasiones, se amplió después de considerar el 5% de diferencia en las mediciones entre los diferentes conductímetros siendo  $594 - 758 \mu\text{S} / \text{cm}$ .

---

### 2.2. Control de calidad determinados para la Bead Master Mix (BMM) y sus reactivos intermedios

A continuación, se establecieron los controles de calidad del siguiente componente, la Bead Master Mix (BMM) y sus reactivos intermedios. La BMM está conformada por los conjugados y el buffer de hibridación por lo que en este apartado se determinó la eficiencia en la conjugación, es decir, el resultado del proceso de unión del grupo amino primario en el extremo 5', al grupo carboxilo de la bead, que es activado mediante tratamiento con EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride).

---

#### A. Reactivos intermedios involucrados en la fabricación de la BMM

---

##### A.1. Buffer de hibridación

Como control de calidad del buffer de hibridación nos planteamos analizar su conductividad tal y como se describe en Material y Métodos. Los resultados mostraron 8 valores atípicos (resaltados en rojo en la Tabla 49) que correspondieron a varias medidas de un mismo lote.

Los valores de conductividad más bajos y más altos obtenidos después de eliminar los valores atípicos fueron  $91.7 \text{ mS} / \text{cm}$  y  $92.5 \text{ mS} / \text{cm}$  (resaltados en verde en la Tabla 49).

## Resultados

Tabla 49. Resultados de las medidas de conductividad de Buffer de Hibridación. Resaltados en color rojo aparecen los valores atípicos encontrados que pertenecen a un mismo lote diferentes medidas.

Lote Buffer Hibridación	Conductímetro	Conductividad (mS/cm)	Temperatura (°C)
1.1	PGK802D	<b>85.0</b>	19.6
1.2	PGK907	<b>85.4</b>	19.0
1.3	PGK802D	<b>85.3</b>	22.8
1.4	PGK907	<b>86.2</b>	19.7
1.5	PGK802D	<b>86.3</b>	18.0
1.6	PGK907	<b>86.5</b>	19.9
1.7	PGK802D	<b>86.8</b>	20.0
1.8	PGK907	<b>86.1</b>	24.2
2	PGK802D	91.7	24.1
3	PGK907	91.9	24.1
4	PGK802D	92.3	24.0
5	PGK907	<b>92.5</b>	23.5
6	PGK802D	91.8	23.0
7	PGK907	92.0	23.4
8	PGK802D	<b>91.4</b>	23.3
9	PGK907	91.8	21.6
10	PGK802D	91.9	22.9
11	PGK907	91.8	22.8
12	PGK802D	91.7	22.9

El rango de conductividad se estableció teniendo en cuenta los valores mínimos y máximos observados. Además, al rango establecido se le añadió la variabilidad observada en nuestros equipos (la llamada variabilidad de medida), que fue de un 5%, lo valores obtenidos fueron redondeados. El rango de aceptación final quedó definido en 87.0 - 97.5 mS / cm.

En cuanto al estudio de estabilidad real, al observar los datos de la Tabla 50, después de 13 meses de almacenamiento comprobamos que la conductividad de los 3 lotes de buffer está dentro del rango establecido de aceptación. Además, en el reactivo no se vio crecimiento microbiano, a pesar de su almacenaje a RT, por lo tanto, el reactivo es estable durante esos 13 meses.

## Resultados

Tabla 50. Resultados del estudio de estabilidad real durante 13 meses de 3 lotes de Buffer de Hibridación.

Tiempo (Meses)	Conductividad (mS/cm)		
	Buffer Hibridación Lote		
	5	6	7
0	91,6	91,9	91,7
3	90,1	90,1	90,1
6	90,4	90,4	90,5
9	92,1	91,9	92,5
13	89,5	89,8	90,2

Sin embargo, a pesar de que los resultados muestran que después de 13 meses la conductividad del buffer de hibridación continúa dentro del rango establecido, como medida preventiva, por ser un reactivo almacenado a temperatura ambiente (18-25°C), decidimos reducir la fecha de caducidad a 6 meses, tiempo máximo estimado de uso teniendo en cuenta las previsiones de fabricación por parte del departamento de producción.

### A.2. Conjugados o couplings

Como se mencionó en el apartado “Material y Métodos” en el proceso de generación de conjugados se establecieron dos controles de calidad, uno referente al proceso de conjugación y otro referente a la cantidad de beads recuperadas en el proceso.

En primer lugar, como muestra la Tabla 51, se valoró el tanto proceso de conjugación así como, las diferencias en los valores de MFI obtenidos entre los EDCs usados (Referencia versus Subóptimo) y las dos concentraciones de antisondas testadas (1  $\mu$ M y 100nM). Entre los resultados existen claras diferencias en los valores obtenidos según la dilución testada. Así, los datos en la dilución 100nM son más restrictivos que con la dilución de menor concentración (1  $\mu$ M), ya que los valores de MFI a partir de 11000 o inferiores son indicativos de que el proceso de conjugados se ha visto afectado y esos conjugados habría que rechazarlos.

## Resultados

Tabla 51. Puesta a punto de la concentración de antisondas como control de calidad del proceso de conjugación. Se testaron 2 concentraciones 1  $\mu\text{M}$  versus 100 nM con el EDC Referencia versus Subóptimo.

PS	MFI (Median Fluorescence Intensity)			
	Concentración Antisonda			
	1 $\mu\text{M}$		100 nM	
	EDC			
	Referencia	Subóptimo	Referencia	Subóptimo
1301	14737	6873	14787	7210
1302	15458	8091	13630	7908
5601	14734	9893	14183	8896
5602	15383	9900	14269	<b>11557</b>
5801	15380	8958	14231	8748
5802	15680	9657	13706	9623
8001	15409	9800	13103	<b>11919</b>
8002	14827	9614	14886	8250
11701	14509	8500	13242	8994
11702	14979	7050	13136	<b>11670</b>
19301	14020	5137	12892	7060
19302	14231	6538	12456	6605
19401	13366	8817	12982	<b>11871</b>
19402	14820	8695	13216	7435

Los valores marcados en verde son los valores de MFI con los que se definió el criterio de aceptación de este proceso de calidad. Así se determinó como criterio de aceptación de este primer control de calidad del proceso de conjugación que valores de MFI fuesen mayores de 11000

En segundo lugar, se realizó el conteo de cada uno de los conjugados en el contador de partículas Multisizer 3 Coulter counter (Beckman Coulter) al final del proceso de conjugación. El número de beads al final del proceso debía ser al menos  $6.25 \times 10^6$ , es decir, al menos el 50% de la cantidad promedio de partida ( $12.5 \times 10^6$ ). Como muestra la Tabla 52, todos los conjugados cumplieron el conteo de  $6.25 \times 10^6$ .

## Resultados

Tabla 52. Recuento de los conjugados mediante Multisizer 3 Coulter counter (Beckman Coulter) al final del proceso de conjugación. Los conjugados al final del proceso deben tener al menos un 50% de las beads de partida, es decir, al menos  $6.25 \times 10^6$  beads.

Sonda	Bead	Contaje	Promedio	$\times 10^6$
RH0130101	33	5960	5740	11
RH0130101	33	5476		
RH0130101	33	5785		
RH0130201	34	5405	5180	10
RH0130201	34	5170		
RH0130201	34	4966		
RH0560101	35	6209	5743	11
RH0560101	35	5446		
RH0560101	35	5573		
RH0560201	36	5424	4981	10
RH0560201	36	4785		
RH0560201	36	4735		
RH0580102	37	6278	6176	12
RH0580102	37	6068		
RH0580102	37	6182		
RH0580203	38	5577	5053	10

## Resultados

RH0580203	38	5013		
RH0580203	38	4569		
RH0800101	42	5332	5300	11
RH0800101	42	5335		
RH0800101	42	5233		
RH0800201	43	5768	5650	11
RH0800201	43	5962		
RH0800201	43	5219		
RH1170103	44	5163	5113	10
RH1170103	44	5141		
RH1170103	44	5035		
RH1170203	45	4872	4865	10
RH1170203	45	5013		
RH1170203	45	4710		
RH1930101	46	3888	3810	8
RH1930101	46	3707		
RH1930101	46	3835		
RH1930201	47	5565	5422	11

## Resultados

RH1930201	47	5072		
RH1930201	47	5630		
RH1940101	51	5091	5137	10
RH1940101	51	5312		
RH1940101	51	5008		
RH1940201	52	5981	5890	12
RH1940201	52	5436		
RH1940201	52	6254		

### A.3. Conjugados o couplings

El buffer MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) fue utilizado durante el proceso de conjugación y constituye un componente esencial para la eficiencia del proceso de acoplamiento sonda-bead. El control de calidad establecido fue la medida de conductividad, la cual fue analizada, al igual que para otros reactivos, mediante dos conductímetros distintos.

Los resultados mostraron dos valores atípicos (Tabla 53 color rojo) (que fueron eliminados). Los valores más bajos y más altos obtenidos después de eliminar los valores atípicos mencionados fueron  $152.7 \mu\text{S} / \text{cm}$  y  $188.4 \mu\text{S} / \text{cm}$  (Tabla 53 color verde). El rango establecido como control de calidad se amplió un 5% por la diferencia entre mediciones y equipos y quedó, por lo tanto, determinado como  $145 - 198 \mu\text{S} / \text{cm}$ .

Por otra parte, también se analizaron los datos del estudio de estabilidad del reactivo a temperatura ambiente durante un mes para confirmar que tras este tiempo los valores de conductividad aún estaban dentro del rango establecido (Tabla 53).

## Resultados

Tabla 53. Resultados obtenidos en la fabricación de diferentes Buffer MES para establecer el rango de medida de conductividad como parámetro de control de calidad.

Lote Buffer MES	Conductímetro	Conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )
1	PGK802D	176.6	22.3
2	PGK802C	176.8	24.6
3	PGK802D	176.5	24.5
4	PGK802C	<b>203</b>	25.7
5	PGK802D	<b>204</b>	25.4
6	PGK802C	180.8	25.7
7	PGK802D	180.5	25.4
8	PGK802C	180.1	25.0
9	PGK802D	178.7	23.0
10	PGK802C	181.7	22.9
11	PGK802D	167.7	23.2
12	PGK802C	167.8	22.8
13	PGK802D	169.2	22.7
14	PGK802C	167.1	22.5
15	PGK802D	165.0	22.7
16	PGK802C	186.4	22.5
17	PGK802D	162.8	22.7
18	PGK802C	157.5	22.5
19	PGK802D	178.9	22.7
20	PGK802C	<b>188.4</b>	22.5
21	PGK802D	182.6	22.7
22	PGK802C	153.5	22.5
23	PGK802D	<b>152.7</b>	23.0
24	PGK802C	157.6	22.1
25	PGK802D	157.5	22.0
26	PGK802C	160.0	22.8
27	PGK802D	154.0	23.5
28	PGK802C	160.7	23.1
29	PGK802D	159.5	22.0
30	PGK802C	161.2	22.7
31	PGK802D	164.2	23.6

## Resultados

Como se deduce de la Tabla 54 la conductividad del buffer MES después de un mes a temperatura ambiente sigue estando dentro del rango establecido 145 – 198  $\mu\text{S} / \text{cm}$ , como aceptable, por lo que se propuso una caducidad de un mes para este reactivo. No se testó un tiempo de almacenamiento más extenso ya que este buffer carece de ningún tipo de preservante que evite el crecimiento bacteriano, además el añadirsele puede implicar un cambio en su pH (4.5 – 4.6) lo que podría conllevar a un impacto en la eficiencia en el proceso conjugación.

Tabla 54. Resultados de las medidas de conductividad del estudio de estabilidad del buffer MES durante un mes a temperatura ambiente.

Buffer MES Lote	Conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	
	Tiempo (Meses)	
	0	1
1	180.8	181.8
2	180.5	181.7
3	180.1	181.9
4	178.7	180.4
5	181.7	184.0
6	164.0	179.9
7	189.4	196.0
8	162.8	175.5
9	172.7	168.1
10	168.8	168.9

### A.4. EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride)

Como hemos mencionado, el EDC es un reactivo que se emplea para producir la unión del grupo amino de las sondas en el extremo 5' al grupo carboxilo de la bead. El EDC es un reactivo higroscópico, por lo que la presencia de humedad afecta a sus propiedades y por consiguiente a la eficiencia de la conjugación.

## Resultados

Por ello como control de calidad se midió su punto de fusión (MP), ya que éste oscila con la humedad absorbida por el compuesto y por lo tanto es indicativo de la presencia o no de humedad en el reactivo (EDC).

Los resultados obtenidos se pueden ver en la Tabla 55. En todos los casos, el rango de MP esperado estaba dentro de los criterios de aceptación ( $\leq 2^{\circ}\text{C}$ ), y el punto de inicio de todas las mediciones fue entre  $108^{\circ}\text{C}$ , los puntos de fusión entre  $112 - 113^{\circ}\text{C}$  y el punto final  $114^{\circ}\text{C}$ .

En cuanto a la variabilidad introducida por el operador, no hubo diferencias significativas entre los operadores (prueba t de Student,  $p = 0.295$ ), aunque sí hubo diferencias significativas entre días (Anova de un factor,  $p = 0.023$ ). Estas diferencias fueron principalmente entre los días 2 y 4 pudiéndose explicar por las posibles diferencias de humedad en la sala lo que afecta, como ya hemos comentado, al reactivo. La Tabla 55 muestra el CV total, que fue de 0.27% (se redondeó a 0.3%) y ésta fue la máxima variabilidad permitida entre los valores de temperatura entre los capilares.

Tabla 55. Resultados de las medidas del onset point del EDC realizado por dos operadores en 4 días distintos.

Onset point ( $^{\circ}\text{C}$ )				
Operador	Dia y operador			
	Dia	Media	SD	CV (%)
1	1	111,2	0,00	0,00
1	2	110,9	0,36	0,33
1	3	110,8	0,15	0,14
1	4	111,4	0,12	0,1
2	1	111,0	0,26	0,24
2	2	110,7	0,35	0,31
2	3	111,1	0,15	0,14
2	4	111,1	0,21	0,19
Operador	Media/operador		SD/operador	CV (%) /operador
1	111.1		0.32	0.29
2	111.0		0.28	0.26
		Total Media	Total SD	Total CV (%)
		111.0	0.30	<b>0.27</b>

## Resultados

### B) Bead Master Mix (BMM)

Definidos todos los controles de calidad de las materias intermedias involucradas en la fabricación de la BMM, se definió su control de calidad.

El control de calidad establecido consistió en contar el número de beads conjugadas presentes en la BMM. Para ello la concentración de beads se calculó de forma teórica teniendo en cuenta sus especificaciones definidas en su certificado analítico (CoA) y un valor de coeficiente de variación (CV %) establecido según las distintas medidas realizadas.

Los cálculos teóricos de la concentración total (bead/mL) mostrados en la Tabla 56 se obtuvieron de los valores definidos en el CoA del proveedor (Luminex), teniendo en cuenta el volumen del vial, su concentración y su número de beads totales mínimos y máximos que podía haber en un vial de 1 mL.

**Tabla 56. Cálculos teóricos de la concentración (bead/mL), volumen vial (mL) y el número de beads totales máximo y mínimo de partida en el proceso de conjugación.**

	Especificaciones teóricas	
	Máximo	Mínimo
Concentración (beads/mL)	$14 \times 10^6$	$11 \times 10^6$
Volumen vial (mL)	1.2	0.98
Número de beads totales	$16.8 \times 10^6$	$10.8 \times 10^6$

A partir de los datos se plantearon dos escenarios de trabajo, teniendo en cuenta en cada uno de ellos las especificaciones teóricas (concentración, volumen vial y número de beads totales) mínimas y máximas. Al primer escenario (condiciones óptimas) se le asignó un rendimiento del 100% (la concentración de beads al principio y al final del proceso de conjugación era idéntica). En cambio, al segundo escenario (peores condiciones) se le supuso un rendimiento sólo del 50% (la concentración final de beads era la mitad de la inicial).

Una vez establecidos estos dos escenarios, se procedió a calcular la concentración teórica de beads en cada conjugado (concentración mínima, promedio y máxima) para un volumen total de

## Resultados

125  $\mu$ L (volumen final por conjugado obtenido en el proceso de conjugación partiendo de 1 mL de bead). Los resultados se muestran en la Tabla 57.

Tabla 57. Cálculos teóricos de la recuperación máxima (100%) y mínima (50%) en la concentración de beads/ $\mu$ L en el proceso de conjugación. Existen 3 posibles escenarios de partida en la concentración de beads: Concentración mínima ( $10.8 \times 10^6$ ). Concentración promedio ( $12.5 \times 10^6$ ). Concentración máxima ( $16.8 \times 10^6$ ).

Cada conjugado en 125 $\mu$ L			
Concentración teórica	Beads/ $\mu$ L		
	10.8x10 <sup>6</sup>	12.5x10 <sup>6</sup>	16.8x10 <sup>6</sup>
Inicial			
Final: Recuperacion 100%	86240	100000	134400
Final: Recuperacion 50%	43120	50000	67200

A continuación, se calculó la cantidad de beads en la BMM. Como ya hemos mencionado la BMM está conformada por dos buffers (TE y Buffer Hibridación) y por los conjugados o couplings (14 es el número de conjugados de ID RHD XT). Además, un lote de ID RHD XT mínimo está formado por 40 kits, por lo que la cantidad de beads calculada en la BMM fue a partir de este número de kits. Los resultados se presentan en la Tabla 58 donde se resumen los volúmenes ( $\mu$ L) de cada uno de los componentes. En la primera columna aparecen los volúmenes de los buffers para preparar una BMM de 40 kits y el volumen por conjugado (24  $\mu$ L), es decir, como se añaden 14 conjugados el volumen total añadido es el que aparece en la segunda columna ( $\times 14$ ) 336  $\mu$ L.

Tabla 58. Volúmenes de los reactivos que conforman una Bead Master Mix (BMM) de 40 kits. En la primera columna aparece el volumen añadir de cada buffer y de cada conjugado. Y en la segunda columna el volumen total de la BMM teniendo en cuenta que se tienen 14 conjugados y de cada uno se añaden 24  $\mu$ L.

Bead Master Mix (40 kits)		
Reactivo	Volumen por conjugado ( $\mu$ L)	
	x1	x14
TE	25000	25000
Buffer Hibridación	41000	41000
Conjugado	24	336
<b>Total</b>	<b>66024</b>	<b>66336</b>

La concentración beads, en los 24  $\mu$ L de cada conjugado, dependió, por un lado, de los dos escenarios planteados al principio, es decir, tasa de recuperación máxima (100%) y mínima

## Resultados

(50%) y, por otro lado, de la cantidad de partida de beads en el proceso de conjugación (Tabla 59).

A partir de estos valores, y como muestran las Tablas 60, 61 y 62 se realizaron los cálculos hasta llegar al rango definido como correcto según el control de calidad. La Tabla 60 recoge los cálculos que determinaron la concentración por tipo de beads en la BMM de 40 kits y la Tabla 61 la concentración total beads (beads/mL) en los 40 kits.

Por último, la Tabla 62 muestra la concentración total beads (beads/ $\mu$ L) en los 40 kits. La concentración calculada depende de la concentración de partida y del porcentaje de recuperación final. En esta última tabla (Tabla 62, datos resaltados en verde) aparece el rango que se definió como correcto según el control de calidad, proveniente de escoger el mínimo y el máximo de los valores obtenidos. Es decir, el límite inferior del rango se determinó con el valor menor y el límite superior con el mayor. Así el rango de aceptación de control de calidad fue 220-680 beads/  $\mu$ L.

**Tabla 59. Concentración (beads /mL) por tipo de bead en los 24  $\mu$ L de conjugado que se añaden a la BMM. La concentración calculada depende de la concentración de partida y del porcentaje de recuperación final.**

En los 24  $\mu$ L de conjugado cuando se prepara la BMM

Concentración teórica por tipo de bead	Beads/mL		
Número beads iniciales	$10.8 \times 10^6$	$12.5 \times 10^6$	$16.8 \times 10^6$
Final: Recuperación 100%	2069760	2400000	3225600
Final: Recuperación 50%	1034880	1200000	1612800



## Resultados

Tabla 60. Concentración (beads /mL) por tipo de bead en los 40 kits. La concentración calculada depende de la concentración de partida y del % de recuperación final.

La concentración para cada tipo de bead en los 40 kits

Concentración teórica por tipo de bead	Beads/mL		
Número beads iniciales	$10.8 \times 10^6$	$12.5 \times 10^6$	$16.8 \times 10^6$
Final: Recuperacion 100%	31201	36179	48625
Final: Recuperacion 50%	15601	18090	24313



Tabla 61. Concentración total beads (beads/mL) en los 40 kits. La concentración calculada depende de la concentración de partida y del % de recuperación final.

La concentración total beads en los 40 kits (en los 14 conjugados)

Concentración teórica total de beads	Beads/mL		
Número beads iniciales	$10.8 \times 10^6$	$12.5 \times 10^6$	$16.8 \times 10^6$
Final: Recuperacion 100%	436816	506512	680753
Final: Recuperacion 50%	218408	253256	340376

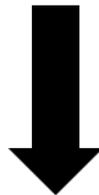


Tabla 62. Concentración total beads (beads/ $\mu$ L) en los 40 kits. La concentración calculada depende de la concentración de partida y del % de recuperación final.

La concentración total beads en los 40 kits (en los 14 conjugados)

Concentración teórica total de beads	Beads/ $\mu$ L		
Número beads iniciales	$10.8 \times 10^6$	$12.5 \times 10^6$	$16.8 \times 10^6$
Final: Recuperacion 100%	437	507	<b>680</b>
Final: Recuperacion 50%	<b>220</b>	253	340

### 2.3. Control de calidad determinado para el SAPE

Como recordamos, Luminex utiliza dos láseres para el análisis de las microesferas. El láser / LED de clasificación roja (635 nm) excita los tintes fluorescentes internos de las microesferas, lo que sirve para identificar cada una de las microesferas de acuerdo con su firma espectral. Y el láser / LED indicador verde (525–532 nm) que detecta si el analito de interés está presente, es decir, el indicador fluorescente unido al analito capturado en la superficie de la microesfera. Por eso, utilizamos como marcador fluorescente la estreptavidina-ficoeritrina (SAPE), por su extremadamente alta afinidad de unión con la biotina presente en el producto de la PCR.

Para evaluar su calidad, y por lo tanto su usabilidad con confianza, se realizaron controles de calidad basados en la presencia de posibles precipitados. Para ello, se cuantificaron mediante el contador de partículas Multisizer 3 Coulter counter (Beckman Coulter) SAPEs sin y con precipitados. Estos últimos fueron descubiertos tras un fallo detectado en Luminex donde se observaba una clasificación incorrecta de las beads y tras varias investigaciones se descubrió la presencia de precipitados en el stock de la materia prima. Ante este descubrimiento se decidió implementar este control de calidad para el SAPE. Asimismo, también se cuantificó con el contador de partículas el diluyente (denominado ISOTON, y que está constituido por una solución isotónica de sulfato sódico, cloruro sódico, imidazol y tetracaína HCL) para confirmar la ausencia de partículas en él.

Los datos en la Tabla 63 marcados en rojo muestran como los SAPES con precipitados presentan valores mayores a 200 partículas/mL, por lo que se determinó este valor como rango de QC, es decir, tanto el ISOTON como los SAPES debían cuantificar por debajo de 200.

## Resultados

Tabla 63. Valores obtenidos con el Multisizer 3 Coulter counter (Beckman Coulter) de muestras de SAPE con y sin precipitados. Marcadas en rojo todos aquellos SAPE que presentaba precipitados.

Sample ID	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Media	SD	CV %
ISOTON	10	8	6	8	2	25
ISOTON	6	5	3	5	2	33
ISOTON	6	5	3	5	2	33
ISOTON	6	5	3	5	2	33
ISOTON	10	10	13	11	2	16
ISOTON	9	11	13	11	2	18
ISOTON	9	11	13	11	2	18
ISOTON	9	11	13	11	2	18
SAPE CON PRECIPITADOS	516	507	467	497	26	5
SAPE CON PRECIPITADOS	528	469	461	486	37	8
SAPE CON PRECIPITADOS	317	381	317	338	37	11
SAPE CON PRECIPITADOS	367	332	321	340	24	7
SAPE SIN PRECIPITADOS	22	89	26	46	38	82
SAPE SIN PRECIPITADOS	37	38	81	52	25	48
SAPE SIN PRECIPITADOS	40	61	65	55	13	24
SAPE SIN PRECIPITADOS	37	49	41	42	6	14
SAPE SIN PRECIPITADOS	27	11	23	20	8	41
SAPE SIN PRECIPITADOS	28	27	25	27	2	6
SAPE SIN PRECIPITADOS	16	17	20	18	2	12
SAPE SIN PRECIPITADOS	48	67	76	64	14	22
SAPE SIN PRECIPITADOS	33	64	39	45	16	36

### 2.4. Control de calidad determinado para el SAPE DILUTION BUFFER

Y por ultimo, el componente SAPE DILUTION BUFFER que se utiliza en la mix de marcaje como diluyente. El parámetro a evaluar fue la conductividad ya que es un parámetro fiable para medir el contenido iónico en una solución.

Los valores de conductividad más bajos y más altos fueron 16.41 mS / cm y 17.31 mS / cm (resaltados en verde en la Tabla 64).

## Resultados

Tabla 64. Resultados obtenidos en la fabricación de diferentes SAPE DILUTION BUFFER para establecer el rango de medida de conductividad como parámetro de control de calidad.

Lote SAPE DILUTION BUFFER	Conductímetro	Conductividad (mS/cm)	Temperatura (°C)
1	PGK802D	16.73	22.1
2	PGK802C	16.74	24.6
3	PGK802D	16.76	24.5
4	PGK802C	16.79	25.7
5	PGK802D	16.84	25.4
6	PGK802C	16.79	25.7
7	PGK802D	16.87	23.4
8	PGK802C	16.89	25.0
9	PGK802D	16.67	23.5
10	PGK802C	16.41	22.9
11	PGK802D	16.82	23.2
12	PGK802C	16.76	22.8
13	PGK802D	17.31	22.7
14	PGK802C	16.46	22.5
15	PGK802D	16.53	22.7
16	PGK802C	16.80	22.5
17	PGK802D	16.72	22.7
18	PGK802C	16.53	22.4

El rango 16.41-17.31 mS / cm se amplió, después de considerar el 5% de diferencia en las mediciones entre los diferentes equipos, por lo que pasó a ser 15.5-18.5 mS / cm.

Por otra parte, también se evaluó la estabilidad del reactivo y para ello se fue midiendo la conductividad de 3 lotes de SAPE DILUTION BUFFER durante 25 meses almacenados a 2-8°C. Los resultados de este estudio están en la Tabla 65 que muestra como el reactivo sigue siendo manteniendo sus valores de conductividad a lo largo de los meses dentro del rango anteriormente citado.

## Resultados

Tabla 65. Resultados de las medidas de conductividad del estudio de estabilidad del SAPE DILUTION BUFFER durante 25 meses a 2-8°C.

Tiempo (Meses)	Conductividad (mS/cm)		
	SAPE DILUTION BUFFER Lote		
	1	2	3
0	17,1	16,9	16,8
3	17,1	16,8	17,1
6	16,9	16,7	16,9
9	16,8	16,5	16,8
13	17,2	17,1	16,8
16	16,8	16,8	17,1
19	16,8	16,8	16,8
25	17,0	17,1	16,9

A la vista de estos resultados concluimos que la conductividad del SAPE DILUTION BUFFER después de 25 meses a 2-8°C sigue estando dentro del rango establecido 15.5-18.5 mS / cm por lo que establecimos que la caducidad de este reactivo fuera 24 meses (siempre en los estudios de estabilidad una vez confirmado el último tiempo de análisis, la caducidad queda definida con un mes menos).

### FASE 3. Validación del test

En todos los estudios que se realizaron para la validación del test se utilizó un panel de 4 muestras (NA19327. HG01894. NA19904 y NA20294, correspondientes a líneas celulares del *Human Genome Research Institute* (NHGRI) procedentes del Coriell Institute for Medical Research (New Jersey, EE.UU). Junto al panel de muestras también se incluyeron en cada experimento dos muestras positivas como control de procesamiento ID RHD CONTROL 1 y ID RHD CONTROL 2 y un Control Negativo (agua).

Este panel cubría todos los genotipos y fenotipos predichos con frecuencias superiores al 1%, con la excepción del resultado del fenotipo "Weak D Type 1 o D+", es decir, que expresan un número menor de sitios antigénicos por eritrocito comparado con un fenotipo D positivo normal, fue reemplazado por "Weak D Type 1" (el más frecuente clínicamente relevante "Weak D Type"). El Weak D Type 1 (RHD: c. 809 T>G) es una mutación puntual en el exón 6 del gen RHD. El panel de ADN fue previamente caracterizado mediante secuenciación bidireccional Sanger.

### 3.1 Estudio de estabilidad real

Para cada punto de tiempo y lote de reactivos evaluados, se determinaron los fenotipos predichos para todas las muestras de ADN genómico y sus réplicas. El software de análisis de ID RHD XT confirmó que los resultados fueron 100% correctos para todas las muestras (y fenotipos) en todos los tiempos analizados (T3. T6. T9. T10. T12. T13. T15 y T16 meses), cumpliendo con los criterios de aceptación ( $\geq 99\%$ ) (Apéndice 1).

Tenemos que señalar que, sin embargo, durante el estudio hubo una serie de desviaciones del protocolo por distintas causas, los cuales no se tuvieron en cuenta para el cálculo del “*correct call rate*” dado que tras la repetición cuidadosa del protocolo no se volvieron a reproducir. Los errores detectados en los distintos tiempos fueron:

- En el tiempo 6 en el lote 3, la muestra llamada "RH2\_L3\_T6\_R10" mostró un resultado del fenotipo predicho “*unknown*” para el antígeno D (RH1). Se analizaron los valores de MFI y lo más probable es que la muestra se hubiese contaminado con el control de procesamiento ID RHD CONTROL 1. El momento de la contaminación se debió de producir al añadir el ADN a la placa de PCR. Se repitió la PCR siendo los resultados correctos.
- Durante el análisis de T9 del lote 3. “RH1\_L3\_T9\_R20” mostró un resultado de “No Call” para los resultados del fenotipo predicho de antígenos HPA-1a y HPA-1b. La réplica 20 de la muestra de RH1 tras el fallo se observó que tenía menos volumen en el pocillo de la placa de PCR (Figura 59), lo que demostró un error de pipeteo durante el proceso de adición del volumen de mix de PCRMM.

## Resultados

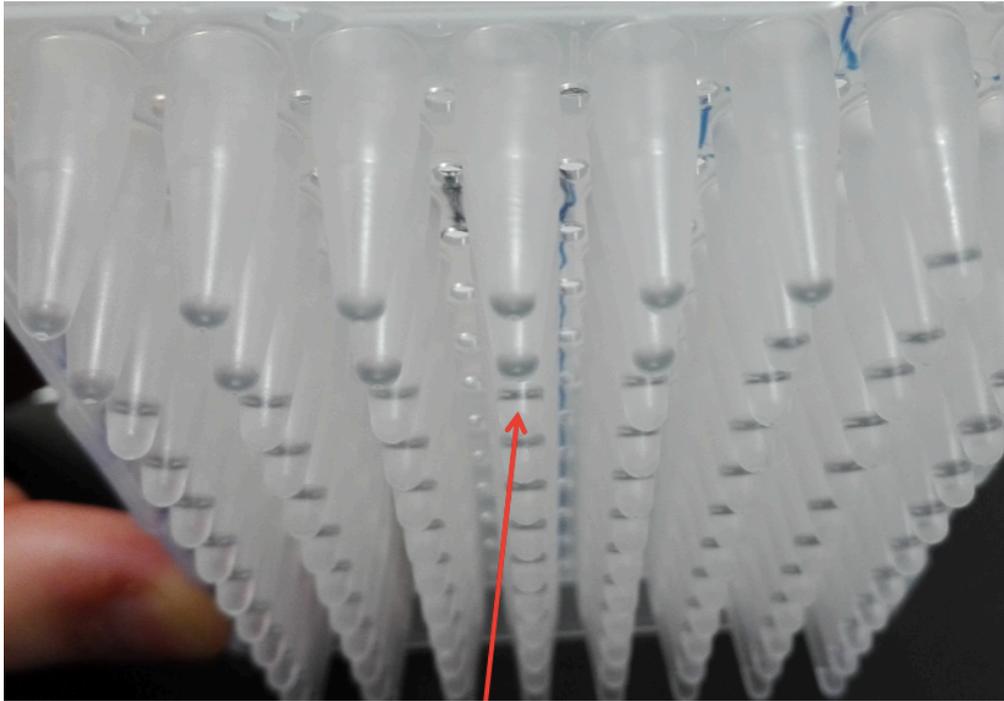
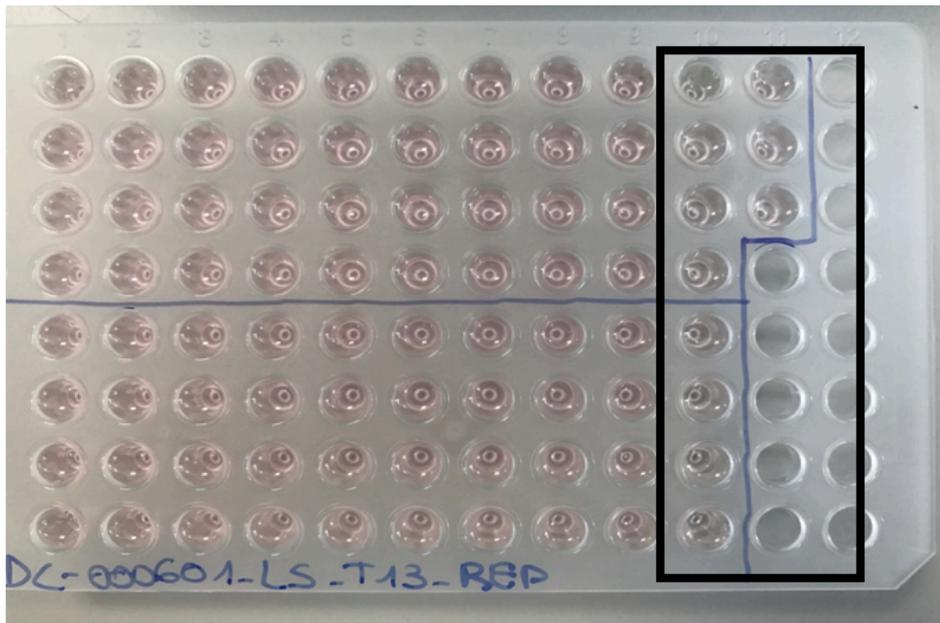


Figura 59. Placa de PCR donde se observa un pocillo con menor volumen que los de su alrededor.

Tras la repetición, se obtuvo un resultado correcto.

- Y, por último, en el tiempo T13 para el lote 5, las muestras llamadas “RH2\_L5\_T13\_REP\_R10” y “RH2\_L5-T13\_REP\_R20” mostraron un resultado de “No Call” para HPA-1 y el resto de las réplicas dieron señales menores. Se observó en la placa analizada en el Luminex (Figura 60) que los pocillos de la última columna mostraron una menor intensidad en el color de la mezcla de marcaje en la placa de hibridación.

## Resultados



**Figura 60.** Placa de hibridación después de su lectura en el Luminex. El color rosa de los pocillos es el habitual de la mix de marcaje a excepción de los pocillos del cuadrado negro, donde la intensidad del color rosa a disminuido significativamente.

La hipótesis más plausible es achacar esta desviación a un error en la dispensación por parte de Luminex del volumen de *sheath fluid* (reactivo utilizado por la máquina durante la lectura de las placas como medio para diluir las muestras y poder ser leída por la óptica de la tecnología). Creemos que se pudo dispensar un volumen de líquido antes de realizar la lectura de la última columna y, por lo tanto, se diluyeron los pocillos, por lo que la señal resultó inferior. Se repitió la placa completa y el resultado fue correcto, así que estos resultados previos desviantes no se tuvieron en cuenta en el ciclo "correct call rate".

En resumen, con los datos obtenidos demostramos que la estabilidad del test es de 16 meses y como la fecha de límite de uso se establece como una duración de hasta un mes antes desde el último tiempo testado en el que se cumplieron los criterios de aceptación, los kits de ID RHD XT, han sido estables hasta 15 meses de almacenamiento a 2 -8°C.

### 3.2 Estudio del vial abierto (*Open Vial*)

Este estudio evaluó la estabilidad del "vial abierto" (ed el vial en uso) de los reactivos del kit ID RHD XT (PCRMM, Bead Master Mix, SAPE dilution buffer y SAPE) almacenados a 2-8 °C.

Después de 6 meses de almacenamiento a 2-8°C, los kits se abrieron y testaron cada tres meses durante un período de 6 meses (T6 = primera apertura, T9 = mes 3 después de la apertura y T12 = mes 6 después de la apertura). Además, se evaluarán dos puntos de tiempo adicionales (T13

## Resultados

y T16) a los 7 y 10 meses después de la apertura tras los resultados obtenidos previos en el estudio de estabilidad.

La llamada “*Call rate antigen*” para todas las muestras y réplicas en todos los puntos analizados a lo largo del tiempo que duró el estudio fue del 100%, por lo que ese cumplieron plenamente los criterios de aceptación ( $\geq 95\%$ ).

Para cada punto de tiempo, se confirmó mediante el software de análisis de ID RHD XT que los fenotipos predichos para todas las muestras de ADN genómico y las réplicas fueron 100% correctos, cumpliendo con los criterios de aceptación ( $\geq 99\%$ ). Los resultados se muestran en el apéndice 1 donde se detalla el porcentaje observado de “*correct calls*” para todas las muestras en cada tiempo analizado (Apéndice 2).

No obstante, en el tiempo 6 meses (T6) cuando se realizó el análisis de las 20 réplicas del panel de 4 muestras de ADN genómico, la réplica de la muestra llamada RH1\_T16\_R17 dio un resultado de “*No call*” para HPA-1 debido a una señal de hibridación baja. Se realizó un gel de agarosa para confirmar la presencia de banda del producto amplificado de la PCR (Figura 61).

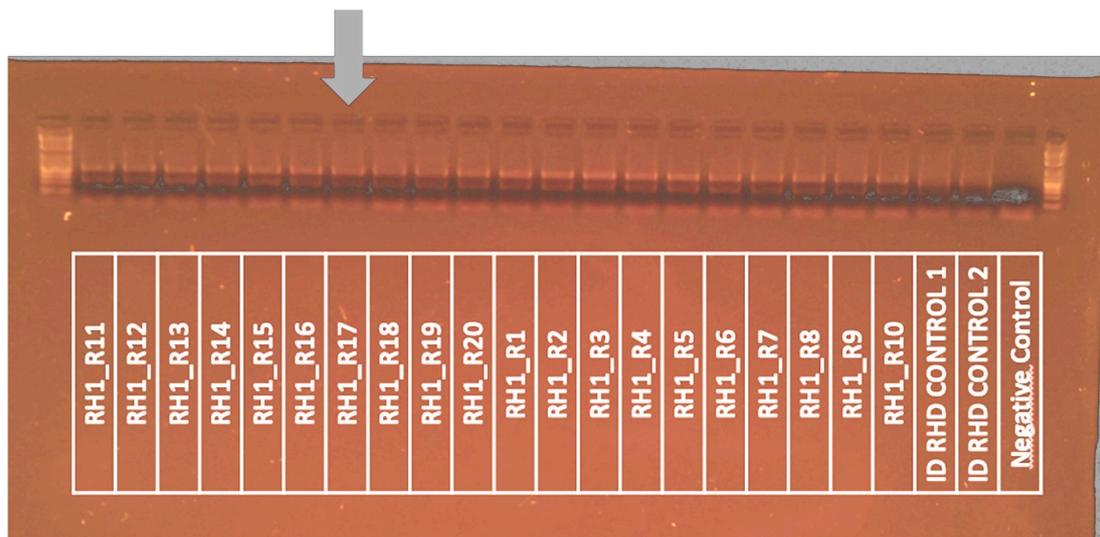


Figura 61. Gel de agarosa al 2% donde aparecen las 20 réplicas de la muestra RH1 y los controles de proceso (ID RHD CONTROL 1 y 2 y Control Negativo).

Como muestra la Figura 61, todas las muestras presentan la misma intensidad en las bandas del gel, por lo que se descartó que hubiera habido un problema en el procesamiento de la PCR en esa réplica. Es posible que se hay acometido un error durante la dispensación del volumen del producto de la PCR en la hibridación, es decir, se añadió un volumen menor a 4  $\mu$ l y menor al volumen calculado en el límite de tolerancia del protocolo [3.8 “*Estudio de tolerancia a la variabilidad en el protocolo (Guard banding)*”] que conllevó que las señales de esa réplica fueran

## Resultados

menores. Por ello decidimos repetir la hibridación de las 20 replicas y en este caso el resultado fue correcto.

Por lo que demostramos la estabilidad hasta 9 meses del vial abierto en kits almacenados previamente durante 6 meses a 2-8°C.

Además, se pudo concluir que el componente BMM, protocolo del experimento detallado en “Material y Métodos”, se puede mantener a RT (18-25°C) durante hasta 30 minutos sin afectar el rendimiento del ensayo.

---

### 3.3 Estudio de detección del límite inferior

Este estudio evaluó el límite de detección inferior (LoD) para el test ID RHD XT, es decir, la concentración menor del ADN a testar a la que se obtuvo el 95% de resultados correctos. Esta concentración se estableció como el límite de detección (LoD).

En total se analizaron 280 datos de cada muestra. La Tabla 52 en el Apéndice 2, resume el total número de observaciones para cada fenotipo predicho en todas las muestras y réplicas por nivel de concentración de ADN y por lote de reactivo.

Los resultados (fenotipo predichos) de las 20 replicas de las 4 muestras resultaron 100% correctos para las concentraciones 20.10. 5 y 2 ng/μL correspondientes a 100. 50. 25 y 10 ng de input de ADN para los dos lotes.

En cuanto a las concentraciones 1. 0.1 y 0.05 ng/μL correspondientes a 5. 0.5 y 0.25 ng proporcionaron el 98%. 44% y 29% de los resultados correctos en el lote 2 y el 99%. 44% y 20% en el lote 3 (Apéndice 3).

El porcentaje de resultados correctos se convirtió matemáticamente en unidades de probabilidad normal acumulativa (probits) y se ajustó mediante un modelo de regresión frente a la concentración de ADN para calcular la tasa de aciertos de 0.95 que determinó el límite de detección (LoD) de cada lote de reactivos.

El modelo probit obtenido se ajustó significativamente a los datos en todos los casos (prueba chi cuadrado de relación de probabilidad logarítmica) y los gráficos residuales en todos los casos no mostraron ninguna tendencia relevante que pudiera indicar un sesgo de ajuste.

Por lo tanto, fue posible predecir el LoD teórico a un nivel de confianza del 95%:

## Resultados

- Para el Lote 2, el LoD (tasa de acierto 0.95) fue de 4.29 ng (IC del 95%: 2.91 – 7.41). (0.858 ng /  $\mu$ l).
- Para el Lote 3, el LoD (tasa de acierto 0.95) fue de 4.25 ng (IC del 95%: 2.89 - 7.29). (0.850 ng /  $\mu$ l).

En el Apéndice 4 se detalla los resultados del análisis probit de los “correct call” de los fenotipos predichos para cada lote de ID RHD XT utilizado en el estudio.

No obstante, durante la ejecución del estudio se encontraron las siguientes desviaciones del protocolo que no afectaron la integridad de los datos del estudio y no tuvieron impacto en las conclusiones del estudio.

Una muestra ID RHD CONTROL 2 en el Nivel 2\_C2 (10 ng /  $\mu$ l) (ADN 50 ng) con el lote 2 ofreció un resultado “*Invalid Test: low average signal*”, es decir, un resultado equivalente al de un Negative Control. El resto de análisis, sin embargo, mostró un 100% *correct call*, incluyendo el ID RHD CONTROL 1 y el Negative Control y el panel de muestras y sus réplicas.

Se realizó un gel de agarosa al 2% con los controles de proceso (Figura 62) y la migración del gel del ID RHD CONTROL mostró la presencia de las bandas esperadas (resultado positivo de la amplificación por PCR), lo que nos llevó a sospechar que el problema ocurrió durante la posterior etapa de hibridación. Es decir, probablemente la razón de la falta de señal fue porque no se agregó el producto de PCR (4  $\mu$ l) a los 46  $\mu$ l de BMM, antes de la hibridación.

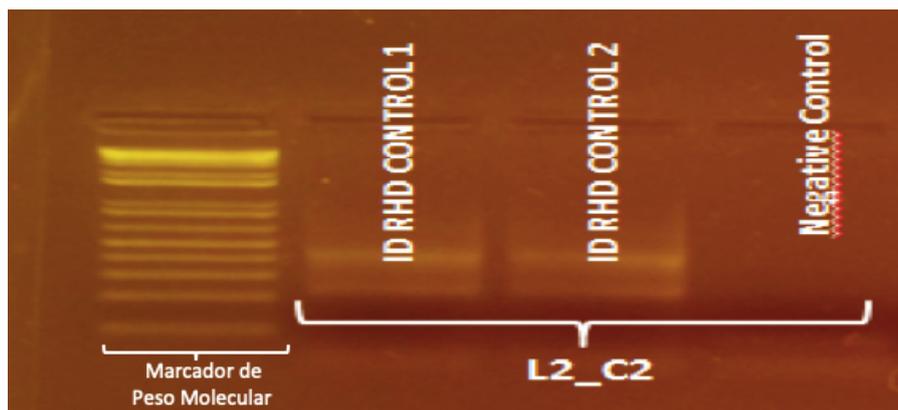


Figura 62. Gel de agarosa al 2% de las muestras controles de proceso (ID RHD CONTROL 1 y 2 y Negative control).

Se realizó la repetición de la hibridación a partir de la misma PCR y los resultados fueron correctos.

## Resultados

La réplica 10 de la muestra RH4 en el Nivel 2\_C2 (10 ng /  $\mu$ l) (entrada de ADN 50 ng) con el lote 2 resultó “*Invalid Test: low average signal*”, es decir, un resultado equivalente al de un Negative Control. El resto de análisis, sin embargo, mostró un 100% *correct call*, incluyendo el ID RHD CONTROL 1 y 2 y el Negative Control y el panel de muestras y sus réplicas.

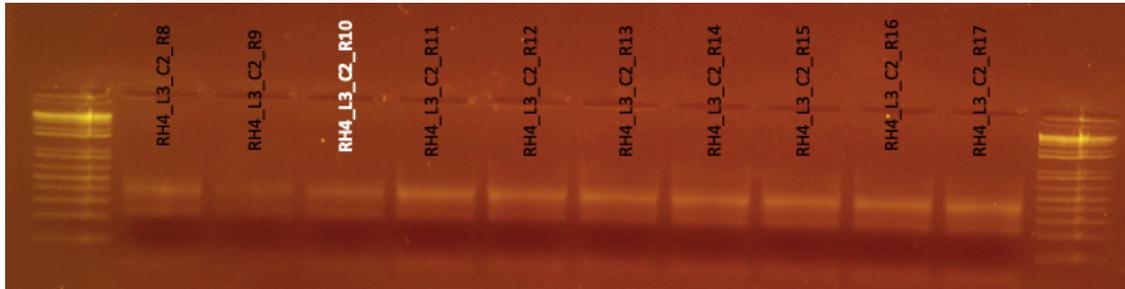


Figura 63. Gel de agarosa con las replicas de la muestra RH4 procesado con el lote 3 y la concentración C2. Marcado en blanco la muestra que procesada en Luminex dio como un Control Negativo.

El gel de agarosa demostró que el producto de amplificación sí estaba presente en la PCR, por lo que el problema debió ocurrir en la etapa de hibridación durante la adición del volumen de ADN. Se repitió la hibridación de las 20 replicas de la muestra y los resultados fueron 100% correctos.

Así, el LoD de ID RHD XT, definido como el valor de concentración de ADN en el que el 95% de las réplicas resultaron correctas fue 2.88 ng, correspondiente a 0.576 ng /  $\mu$ l (lote de reactivos 2) y la cantidad más baja con resultados 100% correctos fue de 2 ng/ $\mu$ l para ambos lotes.

### 3.4 Estudio del límite superior de detección

Al igual que con el estudio anterior también se evaluó el límite superior de detección (LoD) para el test ID RHD XT, es decir, la concentración mayor a la que se obtuvo el 95% de resultados correctos se estableció como el límite de detección (LoD). Las concentraciones testadas se seleccionaron en función de las concentraciones de ADN genómico humano (extraído de sangre total) utilizadas en Progenika Biopharma. A Grifols Company.

El panel de muestras se testó a 150 y 200 ng/ $\mu$ L utilizándose dos lotes de reactivos de ID RHD XT (3201000003 y 3201000004).

Tanto los controles del proceso (ID RHD CONTROL 1 y 2 y Control Negativo) como el panel de muestras de ADN genómico analizado, mostraron resultados válidos para todas las réplicas y condiciones analizadas (lote de reactivos y concentración de ADN). Se considera un resultado válido cuando el experimento se ha ejecutado correctamente, es decir, no hay ningún “Invalid test” o “No call”. Además, todos los fenotipos predichos observados coincidieron con los fenotipos esperados (Apéndice 5).

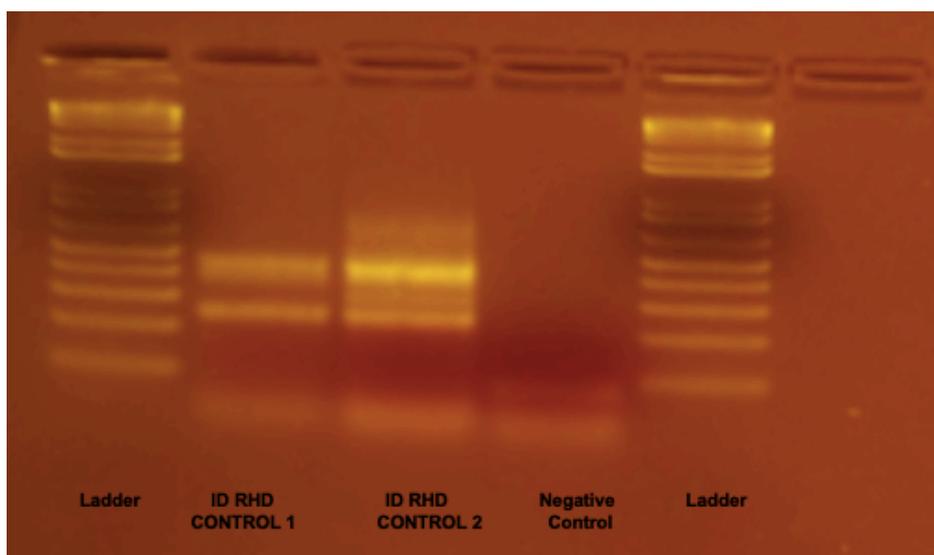
## Resultados

Los resultados mostraron que, las muestras de ADN genómico analizadas con el 3201000003 y el 3201000004 a 150 y 200 ng/  $\mu$ l de concentraciones de ADN proporcionaron un 100% "call rate" (porcentaje de resultados correctos) y un 100% de "correct call" para los fenotípicos predichos. El Apéndice 5 se detalla el porcentaje observado "correct call" de los fenotipos predichos para las muestras de ADN genómico y sus réplicas para cada lote de reactivo y concentración de ADN.

El LoD superior para ID RHD XT sería la concentración de ADN a testar a la cual se obtuvo el 95% de los "correct call". Sin embargo, como se explicó en el apartado de Material y Métodos, los valores de concentración de ADN superiores (150 y 200 ng /  $\mu$ L) testados se seleccionaron en función de las concentraciones máximas históricas de ADN obtenidas tras su extracción a partir de sangre total. Por lo tanto, el LoD superior para ID RHD XT se definió por encima de 200 ng /  $\mu$ L.

Como en otros estudios, se identificó la siguiente desviación del protocolo, que no afectaron la integridad de los datos del estudio y no tuvieron impacto en las conclusiones del estudio, tras las repetición y resultado correcto.

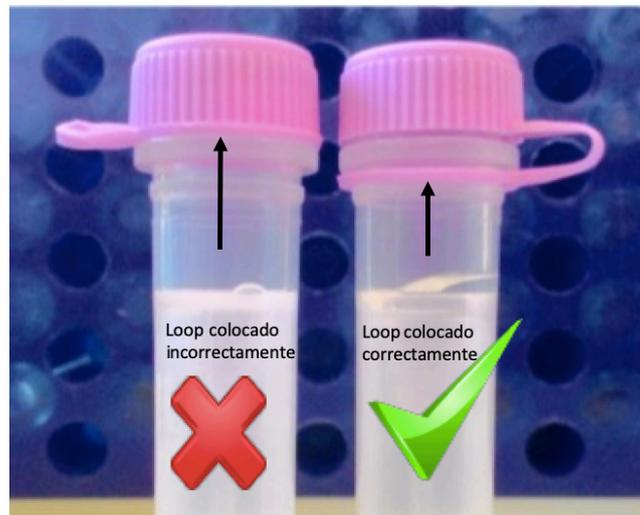
En una placa (concentración de ADN 150 ng /  $\mu$ L: DNA input 750ng), se obtuvo un resultado de genotipo incorrecto para la muestra ID RHD CONTROL 1, siendo el resto del análisis de la placa 100% correctos (incluidos los controles de placa ID RHD CONTROL 2 y Control Negativo y todas las muestras de ADN genómico y sus réplicas). Se obtuvo un genotipo incorrecto para el PS193, cuyo resultado fue "ausente" en vez de "presente". Se realizó un gel de agarosa del producto amplificado junto con los otros dos controles de proceso (Figura 64) y se observó la presencia de menos bandas y menos intensas de lo esperado.



## Resultados

**Figura 64. Resultado del gel de agarosa al 2% de los controles de proceso. El ID RDH CONTROL 2 muestra un patrón de bandas difusas, es decir, una degradación de la muestra.**

Se sospechó que el problema con ID RHD CONTROL 1 ocurrió antes o durante la etapa de PCR. Se continuó con la investigación hasta hallar el problema y se observó que las alícuotas de trabajo almacenadas a 2-8°C de ambos controles. (ID RHD CONTROL 1 e ID RHD CONTROL 2) estaban ensambladas incorrectamente, es decir, la tapa del tubo que presenta lo que denomina “loop” (Figura 65) estaba incorrectamente colocada lo que hace que el tubo quede parcialmente abierto y, por tanto, sufra evaporación.



**Figura 65. Tubos con tapa con *loop* ensamblado correcta e incorrectamente. El tapón consta de dos partes: la rosca y el loop o anillo, colocado por la parte inferior del tubo hasta insertarlo en la muesca perimetral. El tubo de la izquierda (aspa roja) muestra un ensamblaje incorrecto porque el loop se ha colocado desde la parte superior del tubo, a diferencia del tubo de la derecha (tic verde) cuyo loop está debidamente colocado.**

Esta evaporación se confirmó midiendo el volumen de las alícuotas sin usar resultando un volumen inferior a 86  $\mu\text{L}$ , siendo el volumen esperado de 160  $\mu\text{L}$ . Esta evaporación significó que el plásmido sintético estaba más concentrado, incluso dos veces más concentrado por lo que la mayor concentración de sales también pudo ser el motivo de los resultados.

### 3.5 Estudio de verificación de los termocicladores

Este estudio evaluó 3 modelos diferentes de termocicladores para verificar que los resultados obtenidos para el test con ellos no se veían afectados. Los 3 modelos de termocicladores fueron: 1.- *Geneamp® PCR System 9700 (Life Technologies)*, bloque aluminio. 2.- *Veriti® Dx (Life Technologies)* y 3.- *Geneamp® PCR System 9700 (Life Technologies)* bloque “gold”.

El panel de muestras de ADN genómico analizado dio resultados positivos para las 3 réplicas analizadas en cada termociclador. Además, los resultados observados fueron 100% coincidentes con los esperados (Apéndice 6) para cada termociclador.

## Resultados

Sin embargo, en este estudio se encontró una desviación del protocolo con el control del proceso ID RHD CONTROL 1, que mostró un genotipo incorrecto para el polimorfismo *RHD-CE-D hybrid* (PS193) y un resultado de *No Call* para el polimorfismo *RHD: c.1154G>C* (PS 80) con el termociclador Veriti.

La explicación de este resultado incorrecto es la misma que la explicada en el anterior apartado “3.4 Estudio límite de detección superior”, es decir, debido a la evaporación de la muestra debido al montaje incorrecto de la tapa del tubo.

Por lo tanto, los 3 modelos de termocicladores (1.- *Geneamp® PCR System 9700 (Life Technologies)*, bloque aluminio. 2.- *Veriti® Dx (Life Technologies)* y 3.- *Geneamp® PCR System 9700 (Life Technologies)* bloque “gold”) son aptos para usarse en este test diagnóstico siempre que cumplan con las siguientes especificaciones: tapa calentada, tiempos de rampa ajustables, rango térmico mínimo de 2 a 100°C y precisión dentro de  $\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ .

Los termocicladores con diferentes especificaciones deberán verificarse antes de usarse con el test ID RHD XT.

---

### 3.6 Sustancias interferentes

Como ya mencionamos en *Material y Métodos*, el objetivo de este estudio fue evaluar el impacto de posibles sustancias interferentes en el ensayo ID RHD XT. Se analizaron muestras enriquecidas con diversas sustancias interferentes y se confirmó su posible impacto en los resultados del test de diagnóstico.

Ninguna de las sustancias interferentes testadas conllevó a un resultado anómalo o incorrecto. Los resultados para cada condición no impidieron la amplificación y fueron 100% concordantes con los obtenidos previamente mediante la secuenciación bidireccional (Apéndice 7), a excepción del grupo PS 117 (HPA-1) donde se observó que con el interferente hemoglobina, (concentración probada 667 mg /dL) hubo un resultado de "No Call", por baja intensidad de señal, para una de las 3 replicas de la muestra S3. Muestra cuyos fenotipos esperados eran, “D -“ para el grupo Rh y “+” para la HPA-1a, y “0” para la HPA-1b. Esto supuso un 89% de “correct calls” (8 de 9 observaciones totales) para los antígenos HPA1a y HPA1b. Las otras dos muestras cuyo resultado fue presencia del gen *RHD*, no se vieron afectadas por la presencia de interferentes, lo que proporcionó resultados correctos para los dos grupos sanguíneos.

Además, una réplica de la muestra sin interferente, mostró un resultado “No call” para HPA1 por baja señal. Por otra parte, la señal promedio de la muestra (XMFI) dio unos valores de MFI de 1205, valores bajos en comparación con el resto de muestras cuyo promedio fue de 4500. Se

## Resultados

realizó un gel de agarosa y se observó un patrón de banda distinto en la réplica 1 en comparación con la réplica 2 y 3 (Figura 65).

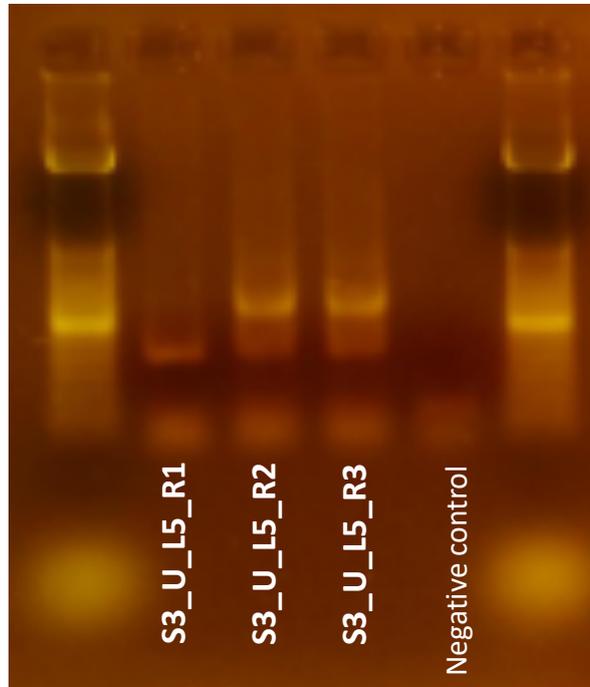


Figura 65. Gel de agarosa al 2% de las 3 extracciones de la misma muestra S3, muestra control o sin interferente.

Estos resultados indicaron que, si bien el ADN si estaba presente en la PCR, la reacción de PCR no se realizó adecuadamente. Se revisaron los datos de concentración y absorbancia (260/280) obtenidos con el espectrofotómetro (Tabla 66) pero no se observaron diferencias sustanciales entre las 3 extracciones (S3\_R1, S3\_R2, S3\_R3) de la misma muestra S3.

Tabla 66. Datos de concentración y absorbancia (260/280) de las replicas de extracción de muestra S3 con el espectrofotómetro Nanodrop.

Sample ID	Concentración (ng/μl)	260/280
S3_L5_R1	55.94	1.91
S3_L5_R2	53.80	2.07
S3_L5_R3	57.96	1.87

Se repitió la PCR con la muestra S3\_R1 en las mismas condiciones y también diluyéndola a la mitad con agua. Los resultados de los fenotipos predichos fueron correctos sólo en la muestra diluida.

## Resultados

A la vista de estos resultados se realizó una investigación de las posibles causas siendo nuestra hipótesis la hemoglobina como posible interferente junto con la posible hemólisis producida por el tiempo de almacenamiento de las sangres antes de realizar su extracción de ADN. Para confirmar que la hemoglobina fuera un posible interferente se realizó un ensayo extra donde se testaron, añadiendo hemoglobina comercial sobre las muestras de sangre antes de su extracción, las concentraciones 500 (previamente testada) y 1000 mg / dL de hemoglobina.

Además, se realizó otro ensayo combinando la concentración de la hemoglobina junto la posible hemólisis producida por el tiempo de almacenamiento. Los resultados mostraron que el rendimiento del test no se vió afectado por la concentración de hemoglobina, pero sí por el almacenamiento de las muestras de sangre, ya que al cabo de 7 semanas a 2-8°C, las muestras de sangre cuyo fenotipo era D negativo se vieron afectadas (Figura 66) produciendo una MFI menor en el PS 117 lo que conllevó a resultados de “No Call” en alguna de las muestras.

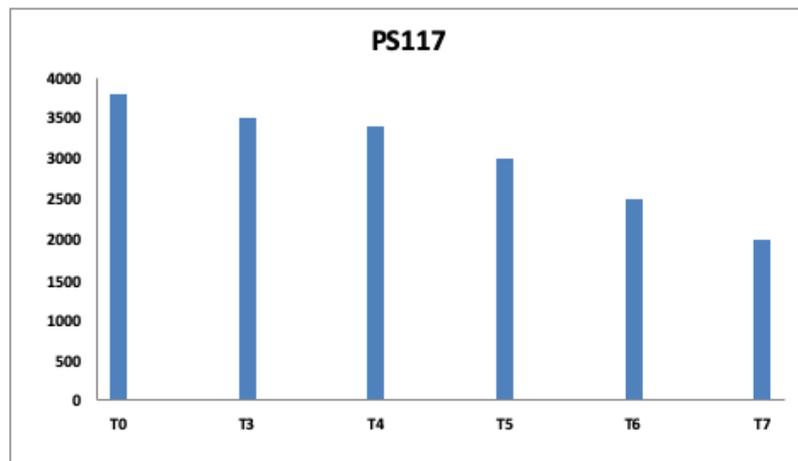


Figura 66. Estudio de estabilidad de sangres almacenadas a 2-8°C durante 7 semanas. En la gráfica esta representado en el eje de la Y los valores de MFI del PS117 y en el eje de las X los tiempos testados en semanas.

Con este resultado se demostró que el tiempo de almacenamiento fue el causante de los dos errores hallados en el rendimiento del test, y así en las instrucciones del tests se incluyó como una advertencia que el tiempo máximo de almacenamiento de las muestras de sangre hasta la extracción de su DNA no superara las 4 semanas.

Con el resto de interferentes el estudio de mostró que el test no se vio afectado y los resultados fueron correctos.

### 3.7 Estudio de precisión intermedia

Como referimos en Material y Métodos, la precisión representa la capacidad del método de medida de dar el mismo resultado en mediciones repetidas del mismo objeto llevadas a cabo en

## Resultados

las mismas condiciones. Para ello el estudio se realizó por dos operadores, en 6 días no consecutivos, durante un período de al menos 20 días.

El total de muestras del panel procesadas en el estudio fue 432.

El total de las 432 replicas del panel de muestras de ADN genómico mostró un resultado válido en cada condición. Además, los resultados de los fenotipos predichos observados coincidieron en un 100% con los esperados.

El Apéndice 8 detalla el porcentaje observado de fenotipos predichos correctos para todas las muestras de ADN genómico y sus réplicas, para cada día, operador, instrumento, lote de reactivos y concentración de ADN. Como se observa, se cumplieron los criterios de aceptación para el estudio.

Los resultados del cálculo del CV (Coeficiente de variación) (%) se muestran en la Tabla 67 (Tabla 67 (a) para los ratios de ausencia / presencia y la Tabla 67 (b) para los ratios de los genotipos llamados 1, 2 y 3). El CV (%) observado para todas las variables analizadas (operador, instrumento, día, lote de reactivos de ID RHD XT) estaba por debajo del 20%, lo que indicaba una baja variabilidad. La variabilidad residual puede interpretarse en parte como la variabilidad que proviene de las muestras utilizadas.

**Tabla 67. Resultados del porcentaje de coeficiente de variación (CV) para “Operador”, “Instrumento”, “Día” y “Lote de reactivos”. La Tabla 67 (a) muestra los resultados de los ratios de ausencia / presencia y la Tabla 67 (b) los resultados de los ratios de genotipado de los 3 clústeres (homocigoto frecuente (3), heterocigoto (2) y homocigoto infrecuente o mutante (1).**

**Tabla 67 (a). Resultados de ratios de ausencia / presente**

Variables independientes	CV (%)	
	Mínimo	Máximo
Operador	0.00	7.28
Instrumento	0.00	16.20
Día	3.15	15.01
Lote	3.37	15.88
Residual	4.58	37.13

**Tabla 67 (b). Resultados de ratios de genotipado de los 3 clusters**

## Resultados

Variables independientes	CV (%)	
	Mínimo	Máximo
Operador	0	0.30
Instrumento	0	12.60
Día	0	6.01
Lote	0.24	15.69
Residual	0.69	16.38

El Apéndice 9 se detalla el análisis de los resultados de los componentes de la varianza. El porcentaje “Correct Calls” de los fenotipos predichos para todas las muestras, réplicas y condiciones fue del 100%. Además, el análisis cuantitativo de los ratios de fluorescencia demostró que no había diferencias estadísticamente significativas en los valores de los ratios entre operadores, instrumentos, días, lotes de reactivos o concentraciones de ADN. Por lo tanto, se demostró una precisión intermedia aceptable en operadores, instrumentos, lotes de reactivos, días y concentraciones de ADN.

### 3.8 Estudio de tolerancia a la variabilidad en el protocolo (Guard Banding)

En *Material y Métodos* definimos la tolerancia a la variabilidad en el protocolo como la capacidad de variación desde el límite de la especificidad hasta el límite de la zona de aceptación o rechazo, es decir, cuánto puede cambiar un parámetro para considerarlo válido o no. Esta tolerancia a la variabilidad en el protocolo del ensayo de ID RHD XT se evaluó, desde la etapa de amplificación del ADN (PCR) hasta la adquisición de datos en el Luminex® (Amplificación. Hibridación. Marcaje y Adquisición de datos).

Cada uno de los pasos principales de procesamiento del test se testaron dos condiciones testadas las llamadas “peores condiciones” y las “mejores condiciones”. Las “peores condiciones” englobaban cambios en los límites inferiores que hacían referencia a tiempos de mezcla, centrifugación y procesamiento y las “mejores condiciones” a cambios en los límites superiores. Se analizaron 3 réplicas de cada una de las muestras del panel con un lote de reactivos para cada uno de las condiciones.

Para cada condición testada. “peores condiciones” y las “mejores condiciones”, el “*call rate*” fue del 100% y se confirmó que los fenotipos predichos para todas las muestras y réplicas fueron 100% correctos (Apéndice 10). Tras los resultados los intervalos aceptables de tolerancia a la variabilidad a los que test funcionó correctamente se detallan en los Apéndices 11 – 14.

## Resultados

Por lo tanto, la tolerancia a la variabilidad en el protocolo, desde la amplificación de ADN hasta la adquisición de datos mediante el Luminex, fue confirmado en una evaluación cualitativa y, por consiguiente, se confirmó la robustez del protocolo dentro de los rangos de variabilidad testados en los que el test de diagnóstico continúa generando resultados óptimos.

### 3.9 Estudio de estabilidad a temperaturas extremas (Estabilidad al “estrés”)

Con este estudio se evaluó el impacto en la estabilidad del test tras someterlo a temperatura extremas durante su transporte.

Para cada condición de “estrés” y tiempo analizado, se confirmó que los fenotipos predichos: para todas las muestras de ADN genómico (panel de cuatro muestras) y sus réplicas (20 réplicas por muestra) se obtuvieron resultados 100% correctos, lo que cumple con los criterios de aceptación ( $\geq 99\%$ ). Además, el “*Antigen Call rate*” en todas las muestras y en todos los tiempos fue del 100%, lo que cumple con los criterios de aceptación ( $\geq 95\%$ ) (Apéndice 15).

No obstante, en el tiempo T12 se produjo una contaminación del *Control Negativo* (NC) en la placa con la condición congelación / descongelación. La contaminación fue detectada porque el mensaje de salida por parte de software de análisis de ID RHD XT no fue el mensaje habitual de “Invalid Test: low average signal”, sino que mostraba resultados de genotipado.

Se migró un gel de agarosa (Figura 67) de los productos amplificados de los tres controles (ID RHD CONTROL 1. ID RHD CONTROL 2 y Negative Control) que mostró la presencia de fragmentos de amplificación en el NC, lo que demostró la contaminación.

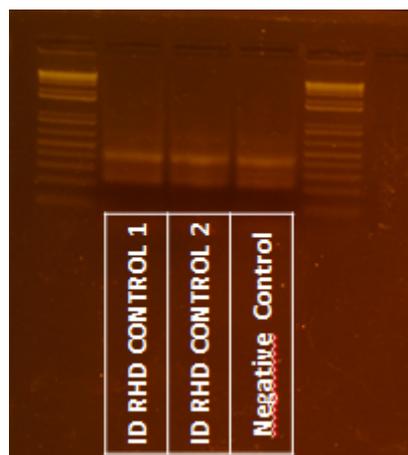


Figura 67. Gel de agarosa con los controles de procesamiento. El Negative Control presenta el mismo patrón de bandas que los otros dos controles, lo que indica que está contaminado.

La placa con esta condición fue repetida desde la PCR y los resultados fueron correctos y, por tanto, los resultados previos erróneos no se tuvieron en cuenta en el cálculo de “Correct Calls”.

## Resultados

Por lo tanto, los kits de ID RHD XT continuaban teniendo el mismo tiempo de uso. 15 meses, definido en el “3.1 Estudio estabilidad real” ya que después de haberlos expuesto a las condiciones de estrés. 3 días a 25°C o 2 ciclos de congelación / descongelación, los fenotipos predichos para todas las muestras de ADN genómico y sus réplicas fueron correctos.

---

### 3.10 Estudio de reproducibilidad

El objetivo fue evaluar la reproducibilidad del test y para ello se analizó el panel de muestras en 3 centros de investigación distinto, obteniéndose los siguientes resultados:

**Sitio 1\_BSTA:** en el procesamiento número 3 del día 10 de estudio se produjo unos resultados incorrectos para las muestras RH2 y RH3, en concreto, en la réplica 3 de estas muestras (RH2\_R3 y RH3\_R3).

La muestra RH2\_R3 dio un resultado “*Invalid test: Low average signal*” (XMFI < 953), es decir, señales similares al Negative Control. Lo más plausible es que no se añadió ADN al pocillo de la placa.

La muestra RH3\_R3 dio un genotipo incorrecto, y analizando los valores de MFI de cada probe set, la causa más probable del error fue la mezcla en el mismo pocillo de las dos muestras RH2 y RH3.

No fue posible la migración en el gel de agarosa o la repetición de la hibridación porque el centro había desechado la placa de PCR después de su procesamiento.

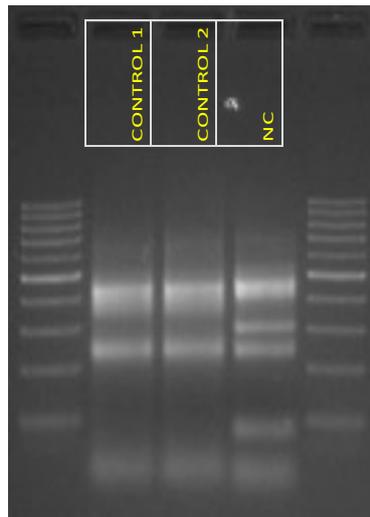
El sitio 1\_BSTA repitió las cuatro réplicas de esas muestras y los resultados fueron correctos y concordantes con los esperados.

Este mismo centro, en el procesamiento número 5 del día 17 mostró un Control Negativo (NC) con un valor en la XMFI por encima del umbral permitido. Mirando las señales obtenidas, parece que la fuente de contaminación provenía del ID RHD CONTROL 2, muestra localizada en el pocillo inmediatamente anterior al NC. El sitio 1\_BSTA llevó a cabo la repetición de toda la placa y los resultados fueron correctos.

**Sitio 2\_QC:** todos los resultados fueron correctos y concordantes con los esperados.

**Sitio 3\_TX:** mostró un Control Negativo con XMFI por encima del umbral permitido en procesamiento número 4 el día 15. Se realizó un gel de agarosa del producto de PCR y se observó la presencia de fragmentos de amplificación en el NC. (Figura 68).

## Resultados



**Figura 68. Gel de agarosa con los controles de procesamiento. El Negative Control (NC) presenta el mismo patrón de bandas que los otros dos controles, lo que indica que está contaminado.**

Se repitió el procesamiento completó desde la PCR y los resultados fueron correctos. Así, después de las repeticiones todos los resultados fueron 100% correctos para cada uno de los sitios. Apéndice 16. Por lo tanto, el test ID RHD XT demostró una reproducibilidad más que aceptable entre sitios, operadores y días.

### 3.11 Evaluación del rendimiento del test a partir de muestras individuales (*Performance Evaluation of individual samples*)

Este estudio evaluó el rendimiento de ID RHD XT en comparación con los métodos de referencia (serología con marcado CE y secuenciación bidireccional por el método dideoxi de Sanger (BDS)).

El número total de muestras que se analizaron fueron 1000, distribuidas en 10% de muestras clínicas (100). 2% de muestras neonatales (20). 16% de Donors tipadas serológicamente como *Weak D* (160). 71.7% de Donors *random* (701).

El estudio mostró que ID RHD XT proporcionó un resultado válido de genotipo y fenotipo para ambos grupos sanguíneos (Rh y HPA) en todas las muestras analizadas. No se produjo ningún fallo del sistema, el “*Correct Call Rate*” fue del 100% y no se obtuvieron resultados no concluyentes. Esas muestras se analizaron por secuenciación bidireccional y se obtuvo una concordancia del 100% con los resultados previos analizados con ID RHD XT, por lo que el resultado del test se consideró correcto.

El análisis del estudio se realizó de la siguiente manera:

## Resultados

- Para las 1000 muestras, el fenotipo predicho ID RHD XT para el antígeno D (RH1) se comparó con la serología. La tabla 68 resume la equivalencia entre los resultados del fenotipo predicho con ID RHD XT y los resultados obtenidos por métodos serológicos. Cualquier otro resultado no informado en la Tabla 69 se consideró discrepante.

**Tabla 68. Equivalencia entre los resultados del fenotipo predicho con ID RHD XT y los resultados obtenidos por métodos serológicos.**

Antígeno	Resultados fenotipos predichos con ID RHD XT	Resultado de serología	Comparacion
D (RH1)	D-	0/-	Concordante
	No amplification variant detected (*)	+/0/-	Concordante
	Weak D Type 1	Du+	Concordante
	Weak D Type 1 or D+	Du+/+	Concordante
	Weak D Type 1_Type2	Du+	Concordante
	Weak D Type 1_Type3	Du+	Concordante
	Weak D Type 2	Du+	Concordante
	Weak D Type 2 or D+	Du+/+	Concordante
	Weak D Type 2_Type3	Du+	Concordante
	Weak D Type 3	Du+	Concordante
	Weak D Type 3 or D+	Du+/+	Concordante
	Weak D Types 1, 2 or 3 not detected (*)	+	Concordante

(\*) RHD gene present. D- (RHD\*DIIIa-CE(3-7)-D or RHD\*Pseudogene genotype) not detected

## Resultados

- Para las 160 muestras fenotípicas de Weak D, los fenotipos determinados con ID RHD XT para D (RH1). HPA-1a y HPA-1b se compararon con BDS. La secuenciación bidireccional se restringió a los polimorfismos RHD interrogados por ID RHD XT (Tabla 69). En la Tabla 70 resume la equivalencia entre los resultados del fenotipo predicho ID RHD XT para los antígenos D (RH1). HPA-1a y HPA-1b y los resultados de secuenciación bidireccional. Cualquier otro resultado no informado en la tabla se consideró discrepante.

**Tabla 69. Tabla que muestra los polimorfismos detectados por ID RHD XT y analizados por secuenciación.**

Sistema grupo sanguíneo	Fenotipo Predicho	Cambio Nucleotídico	PS	Exon gen <i>RHD</i>
Rh	Weak D Type 1	<i>RHD</i> :c.809T>G	58	6
Rh	Weak D Type 2	<i>RHD</i> :c.1154G>C	80	9
Rh	Weak D Type 3	<i>RHD</i> :c.8C>G	13	1
Rh	D-	<i>RHD</i> :c.807T>G	56	6
Rh	D-	<i>RHD-CE-D</i> hybrid	193	3-7
HPA-1	HPA-1a, HPA-1b	<i>ITGB3</i> :c.176T>C	117	NA

NA (No aplica)

**Tabla 70. Equivalencia entre los resultados del fenotipo predicho ID RHD XT para los antígenos D (RH1). HPA-1a y HPA-1b y los resultados de secuenciación bidireccional.**

Antígeno	Resultados fenotipos predichos con ID RHD XT	Resultados secuenciación bidireccional	Comparación
D (RH1)	D-	D-	Concordante
	No amplification variant detected (*)	No amplification variant detected (*)	Concordante
	Weak D Type 1	Weak D Type 1	Concordante
	Weak D Type 1 or D+	Weak D Type 1 or D+	Concordante
	Weak D Type 1_Type2	Weak D Type 1_Type2	Concordante
	Weak D Type 1_Type3	Weak D Type 1_Type3	Concordante
	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concordante
	Weak D Type 2 or D+	Weak D Type 2 or D+	Concordante
	Weak D Type 2_Type3	Weak D Type 2_Type3	Concordante

## Resultados

	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concordante
	Weak D Type 3 or D+	Weak D Type 3 or D+	Concordante
	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
HPA-1a	0	0	Concordante
	+	+	Concordante
HPA-1b	0	0	Concordante
	+	+	Concordante

(\*) RHD gene present. D- (RHD\*DIIIa-CE(3-7)-D or RHD\*Pseudogene genotype) not detected

Aquellas muestras con resultados discordantes se investigaron para resolver la discrepancia. Las discrepancias finales con la serología, como método de referencia, se resolvieron con secuenciación de ADN bidireccional.

Los resultados del estudio fueron los siguientes:

➤ **1000 muestras en comparación con la serología del antígeno D (RH1):**

Hubo 9 muestras discrepantes, clasificadas como "D negative" ("-") en la Tabla 71 por serología, pero como "Weak D Types 1. 2 or 3 not detected" por ID RHD XT. Como hemos comentado, estas discrepancias se resolvieron mediante secuenciación bidireccional y se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 71. En el apéndice 17 se muestran la comparación de los resultados de serología *versus* los obtenidos con ID RHD XT.

**Tabla 71. Tabla que muestra 9 discrepancias entre la serología y ID RHD XT y resueltas por BDS siendo los resultados concordantes con ID RHD XT.**

Código	Serología RHD	Serología D	Serología DU	Resultados fenotipos predichos con ID RHD XT	Concordancia con serología	Resultado BDS	Concordancia con BDS
CV10D0501	-	-	-	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante

## Resultados

CV10D0412	-	-	-	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV10D0828	-	-	-	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV10D0878	-	-	-	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV10D0432	-	-	-	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D2045	-	-	-	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D2414	-	-	-	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D1926	-	-	-	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV10D0825	-	-	-	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante

(\*) RHD gene present. D- (RHD\*DIIIa-CE(3-7)-D or RHD\*Pseudogene genotype) not detected

Todos los resultados de BDS fueron 100% concordantes con los de ID RHD XT. El fenotipo predicho generado por ID RHD XT se refiere únicamente a los alelos descritos que forman parte del test. Las discrepancias con la serología encontradas para estas 9 muestras probablemente surgen de la presencia de otras variantes no interrogadas por ID RHD XT, ni por secuenciación bidireccional. En estas 9 muestras, la ID RHD XT presenta una nota (\*) *RHD gene present. D- (RHD\*DIIIa-CE(3-7)-D or RHD\*Pseudogene genotype) not detected*, que hace referencia sólo a

## Resultados

las tres variantes D negativas interrogadas por el test y que no están presentes en estas muestras.

Además, hubo 3 muestras clasificadas como "D +" por serología, que proporcionaron resultados de fenotipo predichos "Weak D Type 3" con ID RHD XT. Estas muestras se analizaron adicionalmente con BDS para resolver la discrepancia. Los resultados de BDS fueron 100% concordantes con los de ID RHD XT, se comunicó al centro (CVTTH) el resultado y éste determinó que era una limitación serológica. Los resultados predichos del fenotipo para los antígenos HPA-1 también fueron evaluados por BDS para estas 3 muestras y se encontró una concordancia del 100% (Tabla 72).

**Tabla 72. Muestras cuyo fenotipo con el test fue *Weak D type 3* y fueron discrepantes con los datos de serología.**

Código	Serología RHD	Serología D	Serología DU	Resultados fenotipos predichos con ID RHD XT	Concordancia con serología	Resultado BDS	Concordancia con BDS
CV10D0513	+	+		Weak D Type 3	Discrepant	Weak D Type 3	Concordante
CV09D1845	+	+		Weak D Type 3	Discrepant	Weak D Type 3	Concordante
CV09D1033	+	+		Weak D Type 3	Discrepant	Weak D Type 3	Concordante

- **160 muestras de fenotipo weak D seleccionadas en comparación con serología y BDS para el grupo Rh y con BDS para el grupo HPA-1:**

### Grupo sanguíneo Rh

Hubo 75 muestras discrepantes entre serología y el test entre las 160 muestras fenotipadas por serología como weak D. Para 72 muestras el resultado fue "*Weak D Types 1, 2 or 3 not detected*" y para 3 muestras fue "*No amplification variant detected*". Estas muestras se analizaron mediante BDS y los resultados fueron 100% coincidente con resultados de ID RHD XT. Así que las discrepancias con serología (resultado DU+) se debían a la presencia de otras variantes *Weak D* o *Partial D* que no son interrogadas por ID RHD XT, ni por la secuenciación bidireccional (Tabla 73). En el apéndice 18 se muestran la comparación de los resultados de obtenidos en secuenciación *versus* los obtenidos con ID RHD XT.

## Resultados

**Tabla 73. Tabla con las 75 muestras discrepantes entre la serología e ID RHD XT. 72 muestras su resultado fue “Weak D Types 1. 2 or 3 not detected” y 3 muestras “No amplification variant detected. Analizadas mediante BDS los resultados fueron 100% coincidentes con los resultados de ID RHD XT.**

Código	Serología RHD	Serología D	Serología DU	Resultados fenotipos predichos con ID RHD XT	Concordancia con serología	Resultado BDS	Concordancia con BDS
CV09D1265	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D1348	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D1349	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D1351	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D1368	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D1380	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D1385	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D1573	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D1576	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D1588	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante

## Resultados

CV09D1590	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D1605	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D1647	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D1677	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D1689	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D1702	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D1717	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D1719	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D1731	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D1761	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D1774	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D1775	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante

## Resultados

CV09D1776	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D1780	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D1781	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D1785	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D1799	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D1806	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D1813	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D1823	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D1844	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D1847	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D1919	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D1972	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante

## Resultados

CV09D2188	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D2267	+		+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D2327	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D2335	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	No amplification variant detected (*)	Concordante
CV09D2340	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D2357	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D2366	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D2368	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D2382	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D2395	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D2421	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D2430	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante

## Resultados

CV09D2431	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D2437	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV09D2465	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV10D0425	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV10D0427	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV10D0485	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV10D0503	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV10D0521	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV10D0542	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV10D0580	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV10D0581	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV10D0615	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante

## Resultados

CV10D0620	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV10D0642	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV10D0659	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV10D0691	+		+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV10D0711	+	+	+	No amplification variant detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV10D0830	+		+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV10D0839	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV10D0917	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV10D0923	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV10D0997	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV10D1000	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV10D1009	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante

## Resultados

CV10D1011	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
CV10D1013	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
E00180901 7235	D/P			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
E00180904 8438	D p VI			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante
E00180904 8456	D/P			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepante	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordante

(\*)RHD gene present. D- (RHD\*DIIIa-CE(3-7)-D or RHD\*Pseudogene genotype) not detected

Todos los resultados de BDS fueron 100% concordantes con los de ID RHD XT. Las discrepancias con la serología probablemente surgen de la presencia de otras variantes Weak D / Partial D no interrogadas por ID RHD XT, ni por secuenciación bidireccional.

Por lo tanto, un total de 163 muestras Weak D (3 más de lo esperado) finalmente se analizaron en el estudio. 88 de las 163 muestras de fenotipo Weak D (53.9%) fueron clasificadas como *Weak D type 1. 2 or 3* por ID RHD XT y confirmadas por secuenciación bidireccional. La frecuencia de estos subtipos Weak D entre las muestras Weak D analizadas está por debajo de la frecuencia reportada en la población caucásica 70-90% (Daniels. 2013a). La razón de esta diferencia de frecuencia se encuentra en las pruebas anti-D utilizadas en los bancos de sangre para el cribado de primer nivel, que al dar resultados falsos positivos evitó la confirmación Weak D por un segundo nivel de pruebas serológicas. Como ya citamos en Material y Métodos, los tres centros utilizaron dos Anti-D para todos los Donors (primer nivel) y para las muestras D negativas (al menos con uno de los dos anti-D) fueron confirmadas con un método de *Weak D* (segundo nivel).

Por otro lado, ID RHD XT debe evaluar no sólo la determinación correcta de los “Weak D types 1. 2 and 3” (tipificados como D positivos para Patients y Donors), sino también en la detección correcta de otros variantes Weak D y Parcial D (resultados “Weak D Types 1. 2 or 3 not detected”) (tipificados como D negativos para Patients y D positivos para Donors). Otras variantes Weak D/Parcial D diferentes de los subtipos 1. 2 y 3, podrían causar aloinmunización y, como tales, se

## Resultados

consideran D negativas para el tratamiento de los Patients (Flegel *et al.* 2014; Sandler *et al.* 2015).

Por lo tanto, todas las discrepancias Rh resueltas anteriormente se consideran limitaciones o resultados correctos de acuerdo con el uso previsto de ID RHD XT.

### Sistema HPA-1

Con respecto a HPA-1, los resultados de fenotipo predichos obtenidos con el test fueron 100% coincidentes con los resultados de BDS para las 163 muestras comparadas (Apéndice 20). Por lo tanto, la especificidad y sensibilidad obtenida para los antígenos HPA-1a y HPA-1b fue del 100%. Por lo que concluimos que se cumplieron los criterios de aceptación del estudio, lo que respaldó el correcto funcionamiento del test como un dispositivo de diagnóstico *in vitro* y validó su uso para determinar los alelos de los antígenos: D (RH1) y HPA-1a y HPA-1b.

### Resumen global de los resultados

Como resumen global podemos concluir que no se produjo ningún fallo del sistema, y que el "Correct Call Rate" fue del 100% para todas las muestras analizadas, lo que satisface los criterios de aceptación del estudio. Por otra parte, la precisión calculada para todos los fenotipos de antígeno D (RH1) analizados para todas las muestras cumplió con los criterios de aceptación establecidos ( $\geq 99\%$ ) (Tabla 74). Y, asimismo, la especificidad y la sensibilidad calculadas para los antígenos HPA-1a y HPA-1b cumplieron los criterios de aceptación establecidos ( $\geq 99\%$ ) (Tabla 75).

## Resultados

Tabla 74. Precisión calculada para los fenotipos del antígeno D.

Antigeno	Fenotipos predichos	Numero de muestras	Exactitud observada	Exactitud esperada	FAIL/PASS
D (RH1)	D-	361	100%	≥99%	PASS
	No amplification variant detected	15	100%	≥99%	PASS
	Weak D Type 1	22	100%*	≥99%	PASS
	Weak D Type 1 or D+	1	100%	≥99%	PASS
	Weak D Type 1_Type2	NT	NT	≥99%	NT
	Weak D Type 1_Type3	NT	NT	≥99%	NT
	Weak D Type 2	32	100%*	≥99%	PASS
	Weak D Type 2 or D+	1	100%	≥99%	PASS
	Weak D Type 2_Type3	NT	NT	≥99%	NT
	Weak D Type 3	34	100%*	≥99%	PASS
	Weak D Type 3 or D+	1	100%	≥99%	PASS
	Weak D Types 1, 2 or 3 not detected	533	100%	≥99%	PASS

NT: Not tested

\* Weak D types 1, 2 and 3 confirmed by bi-directional-sequencing

## Resultados

Tabla 75. Precisión calculada para los fenotipos de HPA-1.

Antígeno	Positivos	Sensibilidad Observada	Sensibilidad esperada	FAIL / PASS	Negativos	Sensibilidad Observada	Sensibilidad esperada	FAIL / PASS
HPA-1a	157	100%	≥99%	PASS	6	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	46	100%	≥99%	PASS	117	100%	≥99%	PASS

### 3.12 Evaluación del rendimiento del test a partir de mezclas de muestras de sangre y de adn (*Performance Evaluation of pooled donor samples*).

Los resultados obtenidos de las 100 muestras procesadas se dividieron según el tipo de muestra biológica recibida, es decir. 387 muestras de sangre y 613 muestras de ADN. La diferenciación en el tipo de muestra biológica fue fundamental a la hora de evaluar la sensibilidad del test en la detección del gen *RHD* en las mezclas de muestras de sangre y en muestras de ADN.

El objetivo con las muestras de sangre fue validar el ensayo de genotipado ID RHD XT para ser utilizado como una herramienta para el análisis de mezclas de muestras D-C/E+ en la rutina clínica. Y, por otro lado, el objetivo con las muestras de ADN de donaciones serotipadas C/E+ y previamente genotipadas como negativas. Weak D o Parcial D por otro método molecular, fue validar la precisión del ensayo de genotipado (ID RHD XT).

#### Sangre

Se evaluaron con el test un total de 387 donaciones de sangre provenientes de tres centros italianos (Fondazione IRCCS Ca' Granda - Ospedale Maggiore Policlinico (**Milan**), Ospedale Santa Maria della Misericordia (**Udine**) y Azienda USL Ospedale Maggiore di Bologna (**Bologna**)). Estas muestras se testaron tanto de manera individual como en mezclas de hasta 20 muestras.

#### ID RHD XT

Las 387 muestras de sangre tanto analizadas individualmente como en mezclas o pools, serotipadas como D negativo, resultaron con un "call rate" del 100%. Estas 387 sangres se evaluaron en un total de 31 mezclas o pools. De estos 31 pools. 10 pools (102 muestras) resultaron *RHD deletion* correspondiente a un fenotipo D negativo. El resto de pools. 21 (285 muestras), aun habiendo sido clasificadas fenotípicamente como D negativas, el sistema Luminex indicó que tenían presencia del gen *RHD* (Figura 69).

## Resultados

El análisis individual de estos 21 pools (285 muestras) fue: 237 muestras cuyo genotipo fue *RHD deletion*, 3 muestras *RHD\*DIIIa-CE (3-7)-D* (D negativa). 1 muestra *RHD\*weak D type 2* (Weak D). 3 muestras *RHD exon 1 no amplification*; 1 muestra *RHD exon 6 no amplification*; 8 muestras *RHD exon 6 and 9 no amplification*; y 32 muestras *Weak D Types 1, 2 and 3 not detected* (Figura 69).

Por lo tanto, 44 sangres de un total de 387 resultaron con presencia del gen *RHD* lo que supone un 11.4 %. Estos resultados se consideraron no concluyentes al no llegar a conocer su genotipo por presentar variantes no incluidas en el test. A continuación, estas muestras se resolvieron mediante NGS.

### NGS

Las muestras cuyos resultados fueron no concluyentes (44) se analizaron mediante NGS resultando: 17 muestras *RHD\*952T* (D negativa), 6 muestras *RHD\*Ce (3-9)* (D negativa), 2 muestras *RHD\*1007A* (D negativa), 1 muestra *RHD\*147delA* (DEL), 1 muestra *RHD\*IVS3+1G* (DEL), 2 muestras *RHD\*885T* (DEL), 1 muestra *RHD\*1228G* (*Weak D*), y variantes no descritas: 3 muestras *RHD\*del(1-5)*, 2 muestras *RHD\*1151G*, 3 muestras *RHD\*IVS3+1G, 1995A*. 1 muestra *RHD\*156delA, 241T*, 2 muestras *RHD\*Ce (361A, 3-9)*, 2 muestras *RHD\*346-354del*, 1 muestra *RHD\*Ce (3-8)* (Figura 69).

Veintiseis (26) fueron confirmados como D negativos por NGS (7.6%). Se detectaron cinco muestras de DEL o Weak D mal definidas por serología (1.5%) y 14 muestras mostraron nuevos alelos.

# Resultados

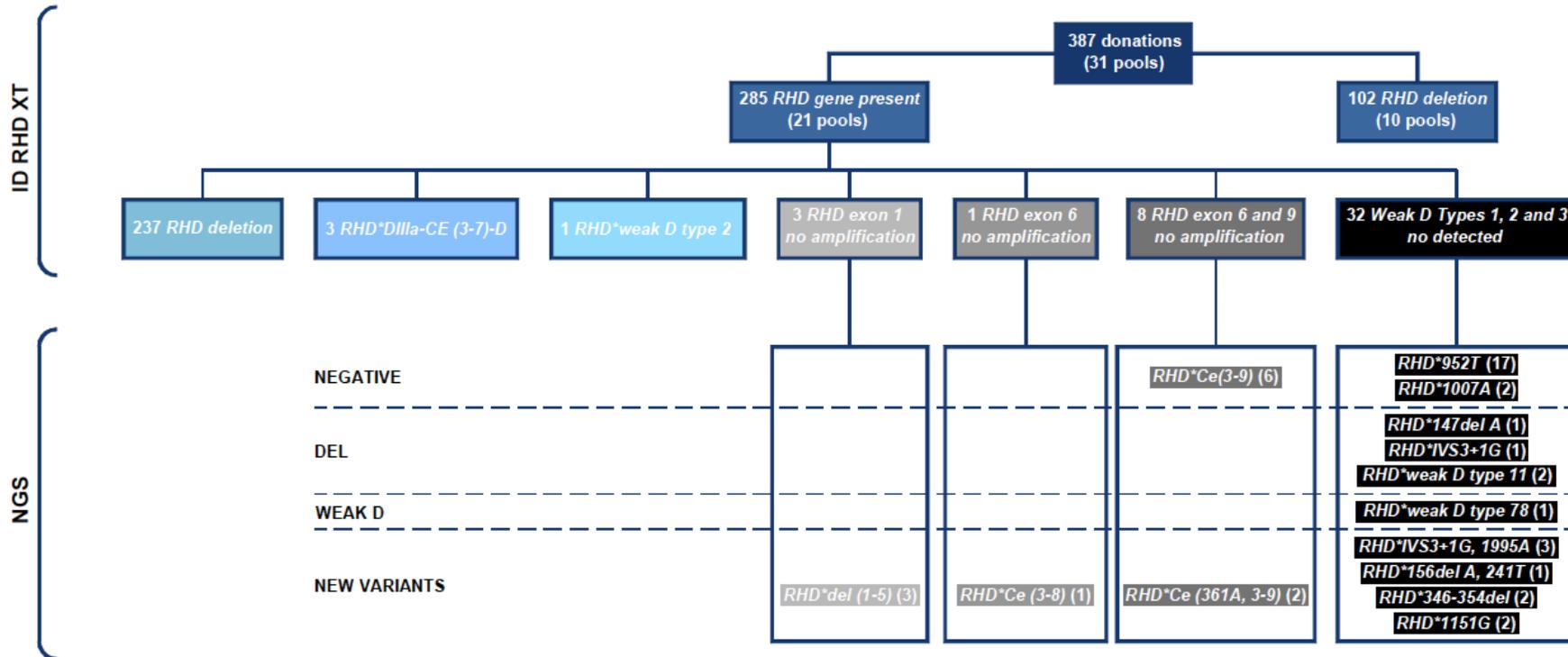


Figura 69. Diagrama de flujos de las 339 muestras de sangre analizadas en mezclas de hasta 20 muestras mediante el test ID RHD XT y NGS.

## Resultados

### ADN

Igualmente se analizaron las muestras de DNA, un total de 613 muestras serotipadas C/E+ y previamente genotipadas como negativas. Weak D o Parcial D por otro método molecular (BioArray HEA BeadChip). Estos ADNs procedían de tres centros italianos (Fondazione IRCCS Ca' Granda - Ospedale Maggiore Policlinico (**Milan**), Ospedale Santa Maria della Misericordia (**Udine**) y Azienda ospedaliera San Camillo Forlanini (**Roma**). Estas muestras se testaron tanto de manera individual como en mezclas de hasta 20 muestras.

### ID RHD XT

Estas 613 muestras de ADN se evaluaron individualmente y en un total de 56 mezclas o pools. De estos 56 pools, 18 pools (213 muestras) *RHD deletion* correspondiente a un fenotipo D negativo. El resto de pools, 38 (400 muestras), el sistema Luminex indicó que tenían presencia del gen *RHD* (Figura 58).

El análisis individual de estos 38 pools (400 muestras) fue: 328 muestras cuyo genotipo fue *RHD deletion*, 4 muestras *RHD\*DIIIa-CE (3-7)-D* (D negativa), 30 muestras *RHD\*weak D type 1 (Weak D)*, 1 muestra *RHD\*weak D type 2 (Weak D)*, 5 muestras *RHD\*weak D type 3 (Weak D)*, 1 muestra *RHD exon 1 no amplification*, 18 muestras *RHD exon 6 and 9 no amplification* y 13 muestras "*Weak D Types 1. 2 and 3 not detected*" (Figura 58).

### NGS

Las muestras cuyos resultados fueron no concluyentes (32) se analizaron mediante NGS resultando: 18 muestras *RHD\*Ce (3-9)* (D negativa), 1 muestra *RHD\*93-94insT* (DEL), 1 muestra *RHD\*IVS3+1G* (DEL), 9 muestras *RHD\*885T* (DEL), 1 muestra *RHD\*28T* (DEL), 1 muestra *RHD\*446A (Weak D type 5)* (Weak D) y 1 muestra cuya variante no estaba descrita *RHD\*del(1-5)*. Estos resultados concordaron con los resultados genotípicos proporcionados por los centros (Figura 70).

# Resultados

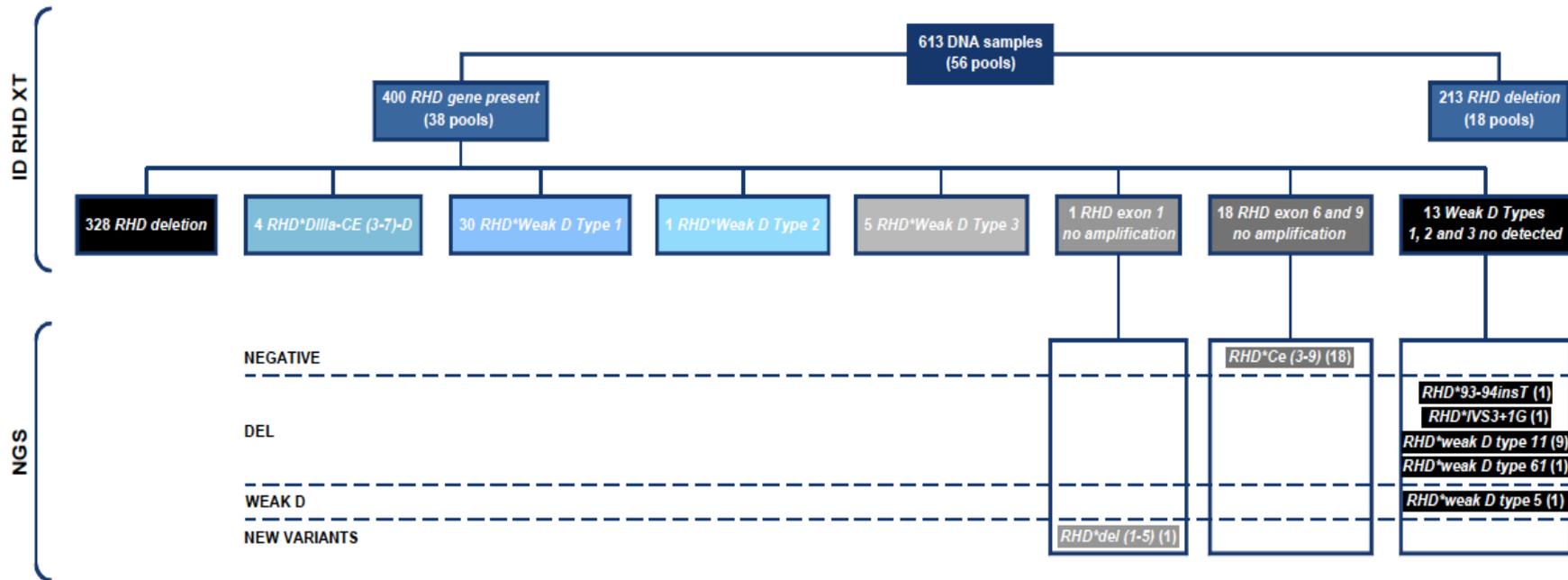


Figura 70. Diagrama de flujos de las 583 muestras de ADN analizadas en mezclas de hasta 20 muestras mediante el test ID RHD XT y NGS.

## Discusión

El grupo sanguíneo Rh se considera como el segundo grupo, después del grupo ABO, en importancia en las transfusiones sanguíneas. Los antígenos Rh clínicamente relevantes por su alta inmunogenicidad son D, C, c, E y e, y están codificados por dos genes adyacentes, *RHD* y *RHCE* (Daniel, 2013a). El antígeno D es el más inmunogénico y causa importantes reacciones hemolíticas asociadas a la incompatibilidad sanguínea donante - receptor, así como a la reacción hemolítica del feto y del recién nacido (HDFN) como consecuencia de la incompatibilidad sanguínea materno-fetal (Connie 2010).

Los epítomos Rh del antígeno D son altamente conformacionales, y los cambios en un solo aminoácido, incluyendo cambios dentro de las regiones transmembrana, pueden afectar a su expresión o incluso dar lugar a epítomos nuevos. La proximidad de los dos genes en el cromosoma 1 y la disposición de los genes en el *locus* (Wagner *et al.* 2000), dan lugar a procesos de recombinación no homóloga que generan polimorfismos de uno o varios nucleótidos. Estos cambios son los responsables principales del origen de la gran diversidad de los antígenos clínicamente relevantes en la compatibilidad sanguínea (Credidio *et al.* 2001; Wagner *et al.* 2001).

Por lo tanto, una correcta caracterización de los antígenos Rh es vital para diversos ámbitos de la práctica médica. En este sentido, la serología ha sido durante décadas la técnica empleada para la determinación de los grupos sanguíneos eritrocitarios. Una de las limitaciones de esta técnica es la disponibilidad de anticuerpos suficientemente específicos y/o sensibles para la detección de las diferentes variantes de los múltiples antígenos sanguíneos. Así, en estos casos la serología puede dar lugar a un falso negativo, al no ser capaz de detectar la presencia del antígeno correspondiente. En estas circunstancias, sin embargo, aunque no detectado, el antígeno sí está presente en la superficie de los eritrocitos y podría, por lo tanto, generar una reacción inmunológica cuando este tipo de sangre entre en contacto con la sangre de un paciente que realmente sí carece de tal antígeno. Este hecho es especialmente relevante en los denominados antígenos nulos o débiles (*weak*), es decir, en los casos en los que el antígeno que define el grupo sanguíneo no se expresa, o bien no lo hace con suficiente nivel, o carece de algunas regiones que son precisamente las que son reconocidas por los anticuerpos usados en la detección serológica. En estos casos, la determinación serológica del grupo sanguíneo no resulta concluyente o simplemente no es posible y es necesario recurrir a técnicas adicionales si se quiere tener un tipaje correcto. Un ejemplo son las variantes *weak D*, que determinan el fenotipo *weak D*, que es el más común de todos los fenotipos asociados al sistema Rh en la población de origen europeo, con una frecuencia de entre el 0.2 y el 1% de toda la población (Wagner *et al.*, 2009), cuya expresión del antígeno D es baja o muy baja, lo que puede causar su incorrecta clasificación como falsos D negativos. Los estudios moleculares distinguen estos fenotipos, lo que facilita su caracterización y por consiguiente la toma de decisiones sobre la

terapia transfusional. Hay que destacar que, además de conseguir preservar la salud de los pacientes con una correcta identificación del sistema Rh, se consigue adicionalmente paliar la escasez de unidades de sangre D negativas debido a una prevalencia baja de este fenotipo (Granier *et al.* 2017). Por ello, siempre que se detecta un resultado Rh D discordante o un resultado serológico de fenotipo tipo weak D en pacientes, incluidas mujeres embarazadas o mujeres en edad fértil y recién nacidos, se recomienda el genotipado de *RHD* (Flegel *et al.* 2014; Sandler *et al.* 2015; Daniels, 2013b).

Por lo tanto, en este trabajo nos hemos propuesto el diseño y la optimización de un test de genotipado sanguíneo, denominado ID RHD XT que pueda solventar esta necesidad que surge en la práctica médica.

### FASE 1. Diseño y optimización del test de genotipado sanguíneo (ID RHD XT)

Existen evidencias de que algunas unidades de eritrocitos con una expresión débil de D pueden escapar a la detección por métodos serológicos estándares, lo que puede conducir a ser malinterpretados como RhD negativos (Orzińska *et al.*, 2013). Como alternativa se pueden usar métodos más sensibles como la prueba indirecta de antiglobulina (TAI) (Granier *et al.*, 2017), pero aun así, nos encontramos que no es posible detectar todas las muestras weak D (Mota *et al.*, 2005). Además, la tipificación serológica de rutina de Rh D no puede distinguir entre subtipos D débiles o varios fenotipos D parciales (Flegel *et al.* 2014; Sandler *et al.* 2015). Por todo ello, la asignación correcta de todos los donantes de sangre como RhD positivos o RhD negativos utilizando sólo la serología no es posible. En este sentido, las herramientas de genotipado molecular nos permiten realizar una categorización más resolutive pudiendo clasificar las diferentes variantes como las “weak” y las “parcial” (Granier *et al.*, 2017).

La cantidad de antígeno D en los eritrocitos weak D varía en función de la severidad del efecto de las posibles alteraciones que regulan los niveles de expresión de la proteína. Cada tipo de weak D tiene una expresión distinta de antígeno D en los eritrocitos que hace que la detección serológica antígeno-anticuerpo pueda ser variable. De esta manera, eritrocitos con una cantidad muy reducida de antígeno D, como el weak D tipo 2, pueden no llegar a detectarse con algunos reactivos comerciales anti-D o con algunos tests. Esto puede dar lugar a discrepancias en la tipificación de D, es decir, el paciente podría ser D+ o D- en distintos centros o incluso en el mismo centro por el uso de reactivos de distintos fabricantes o por cambiar la técnica de tipado (Daniels, 2013a). Se ha descrito que en los donantes RhD negativos entre el 1.5-2% de las muestras (aparentemente RhD negativas) expresan la proteína RhD (Gowland *et al.*, 2014), algunas de los cuales tienen alelos weak D tipo 1 o 2 (Polin *et al.*, 2009; Orzińska *et al.*, 2013).

## Discusión

Por ello, en el diseño de este test se han incluido las variantes weak D tipo 1 (*RHD*: c. 809 T>G; rs121912763), weak D tipo 2 (*RHD*: c. 1154 G>C; rs71652374) y weak D tipo 3 (*RHD*: c. 8 C>G; rs144969459) que son los más comunes entre los subtipos D débiles (Flegel, 2011). Habitualmente, debido a la baja frecuencia en la población, la expresión del antígeno weak D se encuentra principalmente en individuos hemocigotos, con un único alelo *RHD* que tiene una alteración genética. Los **pacientes** con delección de un alelo y presencia de weak D tipo 1, 2 y 3 no son susceptibles de generar respuesta inmunogénica al ser tratados con sangre Rh D positiva, por lo tanto, **pueden considerarse** a efectos transfusionales como Rh D positivos, no precisando de prácticas clínicas especiales en este sentido (Noizat-Pirenne *et al.* 2007). En el caso de los **donantes** weak D tipo 1, 2 o 3, a pesar de su débil expresión, no deben considerarse como Rh D negativos sino que **es esencial que se consideren** como D+, ya que son potencialmente inmunogénicos.

Con el diseño de este ensayo, hemos conseguido ofrecer una determinación más precisa del grupo Rh, y en concreto, del genotipado de los weak D, lo que estimamos que representa un ahorro del 2.4 al 5% de las unidades de sangre RhD negativas (Sandler *et al.*, 2015). En consecuencia, el uso generalizado de nuestro sistema ID RHD XT conllevaría a un uso más eficiente de estas sangres, y a su vez garantizaría que dichas unidades serían dedicadas a pacientes que realmente están en riesgo de aloinmunización anti-D. Asimismo, en el caso de las embarazadas el genotipado de las variantes RhD incluidas en nuestro sistema ID RHD XT permite una administración más eficiente de la profilaxis de la inmunoglobulina Rh (RhIG), lo que permite reducir los costes innecesarios y posibles efectos secundarios. En 2014, el Colegio de Patólogos Americanos (*College of American Pathologists (CAP)*) y el Comité de Recursos de Medicina de Transfusión (*Transfusion Medicine Resource Committee (TMRC)*) informó de los resultados de una encuesta a más de 3100 laboratorios concerniente a su políticas y procedimientos para la detección de los fenotipos weak D y la administración de inmunoglobulina Rh (RhIG). Entre los resultados de esta encuesta se observó una falta de estandarización en la práctica clínica a la hora de actuar con los fenotipos weak D. Además, se calculó que de 3.953.000 nacimientos en Estados Unidos, 13.360 madres tienen un fenotipo D serológico débil, que si es confirmado mediante el genotipado de *RHD* se considerarían como RhD-positivo lo que equivaldría a un ahorro de ~24.700 inyecciones de RhIG cada año (Sandler *et al.*, 2015; Kacker *et al.*, 2015). De igual manera se estimó que en Europa el ahorro de profilaxis de la inmunoglobulina Rh (RhIG) era de ~35.600. En términos costo-efectividad el punto de equilibrio para el uso del genotipado de Rh en el contexto del embarazo y la profilaxis anti-D es de 256 \$ (Kacker *et al.*, 2015).

## Discusión

Con respecto a lo anteriormente mencionado, también se han incluido en el diseño del test ID RHD XT las variantes genéticas más frecuentes que expresan los fenotipos D negativos, como son: la delección completa del gen *RHD*, que representa un 15% en la población de origen europeo o bien la presencia de tanto el alelo *RHD\*ψ* (*RHD\*Pseudogene*) como del alelo híbrido *RHD\*DIIIa-CE (3-7)-D*, ambas frecuentes en la población africana (Szulman *et al.* 2012). En un estudio realizado en población africana con individuos D negativos (82) se determinó que la frecuencia del total de individuos para la variante *RHD\*Pseudogene* (*RHD\*ψ*) estaba presente con un 66%, y con un 15% para la variante *RHD\*DIIIa-CE (3-7)-D* (Singleton *et al.*, 2000; Wagner *et al.* 2000; Szulman *et al.* 2012; Khosroshahi *et al.*, 2019).

La importancia de un correcto genotipado también es extensible al análisis de antígenos plaquetarios para las embarazadas, por ello, se incluyó en nuestro sistema ID RHD XT la posibilidad de caracterizar el gen *ITGB3* (sistema HPA-1): HPA1a y HPA1b. Su determinación ayuda a detectar el posible riesgo de trombocitopenia neonatal aloinmune (TNAI) durante el embarazo por incompatibilidad en gestantes HPA-1a negativas (Muñiz *et al.*, 2012). En la población embarazada de origen europeo, el 2.1% es negativo para HPA-1a, de los cuales el 10% producirá aloanticuerpos contra HPA-1a (1 de cada 500 embarazos), lo que lleva a una trombocitopenia severa en aproximadamente 1 de cada 1.500 embarazos (Winkelhorst *et al.*, 2019)

Hemos estimado que la tecnología xMAP de Luminex® y los principios de la citometría de flujo, ofrecían las mejores garantías de simplicidad, eficiencia y exhaustividad de cobertura genética lo que nos ha permitido desarrollar una herramienta de caracterización genotípica, cuyo uso fuera aplicable tanto en pacientes como en donantes. Asimismo, constituye una herramienta de diagnóstico que está basada en tecnología consolidada, y XMAP es una técnica creada ya a finales de los años 90 y que se encuentra actualmente lo suficientemente consolidada y madura. Adicionalmente, la tecnología XMAP ofrece un alto rendimiento, permitiendo un análisis rápido, rentable y simultáneo de múltiples analitos dentro de una sola muestra biológica (Dunbar, 2006). Además, a esto se le une la experiencia previa de 'Progenika Biopharma, a Grifols Company' en el uso de esta tecnología. Así, nuestra compañía ha desarrollado ya otros tests de genotipado sanguíneo, como el ID CORE XT, test que determina de forma simultáneamente 37 antígenos de 10 grupos sanguíneos o ID HPA XT, test que determina los antígenos plaquetarios más relevantes.

El test desarrollado en este trabajo es un ensayo de genotipado cualitativo, basado en la amplificación de la secuencia diana, que en nuestro caso codifican antígenos eritrocitarios (antígeno D) y antígenos plaquetarios (HPA-1a y HPA-1b) humanos. Esta tecnología utiliza sondas alelo específicas unidas a microesferas previamente codificadas por su espectro de fluorescencia, que hibridan específicamente con los productos de PCR marcados. Un paso

## Discusión

posterior de marcaje con estreptavidina-ficoeritrina (SAPE) de los productos amplificados (en cuya síntesis se incluyen nucleótidos marcados con biotina) permite la detección y cuantificación de la señal de hibridación. Así, el test genera una reacción múltiple simultánea en un solo pocillo, con lo que se evita la necesidad de llevar a cabo métodos separados en paralelo. El software que acompaña a este test produce tanto un genotipo como un fenotipo predicho para cada muestra. El fenotipo predicho generado se infiere únicamente de los alelos descritos en la **Tabla 63** previamente recogidos en la bibliografía.

**Tabla 63.** Lista de variantes genotipadas por ID RHD XT (nomenclatura ISBT).

RHD/HPA-1 allele	ISBT name	Aminoacid	Nucleotide change	dbSNP ID	chr position	ID RHD XT Antigen (ISBT)
<i>WeakD type1</i>	<i>RHD*01W.1</i>	V270G	<i>RHD:c.809T&gt;G</i>	rs121912763	chr1:25629820	D (RH:1)
<i>WeakD type2</i>	<i>RHD*01W.2</i>	G385A	<i>RHD:c.1154G&gt;C</i>	rs71652374	chr1:25648380	D (RH:1)
<i>WeakD type3</i>	<i>RHD*01W.3</i>	S3C	<i>RHD:c.8C&gt;G</i>	rs144969459	chr1:25599046	D (RH:1)
<i>RHD*Pseudogene</i>	<i>RHD*04N.01</i>	Y269X	<i>RHD:c.807T&gt;G</i>	rs141833592	chr1:25629818	D (RH:1)
<i>RHD*DIIIa-CE(3-7)-D</i>	<i>RHD*03N.01</i>	Hybrid	<i>RHD:IVS3+3100 A&gt;G</i>	-	chr1:25620382	D (RH:1)
<i>RHD deletion</i>	<i>RHD*01N.01</i>	No protein	Gene absence	-	-	D (RH:1)
<i>HPA1a, HPA1b</i>	N.A.	<i>L33P</i>	<i>ITGB3:c.176T&gt;C</i>	rs5918	chr17:45360730	HPA-1a HPA-1b

ISBT: International Society of Blood Transfusion

Como hemos ido comentando a lo largo de este proyecto, los 6 fragmentos que contienen los 7 polimorfismos analizados se fueron optimizando durante el desarrollo del test. En la **Tabla 64** se describen los amplicones y polimorfismos finalmente determinados con el ensayo.

Tabla 64. Descripción de los amplicones y polimorfismos ID RHD XT.

Internal amplicon code	Amplicon target	Polymorphism description	Possible genotypes
PS 13	RHD exon1	RHD:c.8C>G	RHD no exon 1 amplification
			RHD:c.8GG
			RHD:c.8CG
			RHD:c.8CC
PS 56	RHD exon 6	RHD:c.807T>G	RHD no exon 6 amplification
			RHD:c.807GG
			RHD:c.807TG
			RHD:c.807TT
PS 58	RHD exon 6	RHD:c.809T>G	RHD no exon 6 amplification
			RHD:c.809GG
			RHD:c.809TG
			RHD:c.809TT
PS 80	RHD exon 9	RHD:c.1154G>C	RHD no exon 9 amplification
			RHD:c.1154CC
			RHD:c.1154GC
			RHD:c.1154GG
PS 117	ITGB3 exon 3	ITGB3:c.176T>C	ITGB3:c.176CC
			ITGB3:c.176TC

## Discusión

			<i>ITGB3:c.176TT</i>
<b>PS 193</b>	<i>RHD</i> intron 1	<i>RHD-CE-D hybrid</i>	<i>RHD-CE-D no hybrid</i>
			<i>RHD-CE-D hybrid</i>
<b>PS194</b>	<i>HGH</i> gene	Internal amplification control	Internal amplification control

Dado que el gen *RHD* puede estar delecionado, lo que de hecho constituye una de las variantes que interroga el test, se incluyeron asimismo dos controles internos de amplificación, un control de *HGH*, la proteína codificada por el gen *GH1* cuya secuencia está altamente conservada en el genoma humano (Ballerini *et al.* 2008), y *HPA-1* localizado en exón 3 de gen *ITGB3*, y que se eligió con un doble objetivo: por un lado, es una región donde no se han descrito deleciones, y por otro aporta información adicional útil para el manejo de las mujeres embarazadas *HPA-1* negativas. Esta información adicional está relacionada con la llamada trombocitopenia fetal o neonatal aloinmune (TFNA), proceso agudo donde las plaquetas fetales son destruidas durante la gestación por un anticuerpo circulante de tipo IgG presente en la madre, que atraviesa la barrera placentaria y va dirigido contra un antígeno específico plaquetar (*HPA*) heredado del padre. La TFNA se considera el proceso equivalente a la enfermedad hemolítica del recién nacido por incompatibilidad Rh, sin embargo, la diferencia con ésta, es que la TFNA puede aparecer durante la primera gestación hasta en un 30-50% de los casos. En la población de origen europeo, tiene especificidad frente al antígeno específico plaquetario *HPA-1a* en más del 80% de los casos (Rodríguez Wilhelmi *et al.* 2008).

Como hemos comentado con anterioridad, el ensayo ID RHD XT, está formado por cuatro reactivos (PCRM Master Mix (PMM), Bead Master Mix (BMM), SAPE y SAPE DILUTION BUFFER) cada uno de ellos juntos con sus materias intermedias fueron optimizadas en esta fase de desarrollo.

Las secuencias de oligonucleótidos diseñadas, primers y sondas, que conforman parte de la PMM y de la BMM se diseñaron de acuerdo con las secuencias genómicas de los genes correspondientes. En el caso de los primers se emplearon secuencias intrónicas específicas del gen *RHD* para evitar la amplificación del gen *RHCE* con alta homología de secuencia. En el caso de la PMM nos enfrentamos a dos retos en su optimización; por un lado, que la PCR diseñada debía ser multiplex y, por otro lado, que las condiciones de amplificación tenían que ser las mismas que las utilizadas en los otros dos ensayos de 'Progenika Biopharma, a Grifols

## Discusión

Company': ID CORE XT e ID HPA XT, ya que ID RHD XT, se prevé incluir como parte de este *portfolio* de tests. Para ello, a los primers se le añadió unas secuencias universales de 18 nucleótidos, llamadas TAGs, en su extremo 5' para así mantener la T melting homogénea y conseguir una amplificación similar para todos los amplicones usando el mismo programa de PCR que con los otros dos ensayos.

A su vez también se tuvo en cuenta las limitaciones intrínsecas a la propia tecnología xMAP® de Luminex® y para ello el tamaño de amplicones diseñado fue de 200 a ~400 pares de bases (pb). Con este requisito se minimizaba la posibilidad de impedimento estérico, es decir, el efecto producido cuando el volumen ocupado por un grupo funcional o átomo en una molécula impide que otra parte de la misma reaccione, y afecte, por tanto, a la eficiencia de la hibridación (Dunbar, 2006). La eficiencia en la hibridación se plasmaría en la señal MFI (Median Fluorescence Intensity) obtenida de la hibridación de los productos amplificados (Tabla 37). Uno de nuestros requisitos a la hora de valorar esas señales de amplificación fue la relación entre la "señal específica" / "background" así como las MFIs en muestras heterocigotas cuyos valores debían ser mínimo 3000, y valores similares entre ambas sondas. Estos requisitos están estrechamente relacionados con el diseño de las sondas que a continuación se discuten. Para la detección específica de los alelos de cada polimorfismo (asumiendo dos alelos por polimorfismo) se utilizan dos sondas, una complementaria (y específica) a la secuencia del alelo A (referencia) y la otra complementaria (y específica) para el alelo B (alternativo). Se diseñaron con el objetivo de que mapeasen en regiones que incluían los polimorfismos testados (independientemente de si son regiones exónicas o intrónicas). Sin embargo, a lo largo de la región de anillamiento de las sondas, pueden ocurrir otros polimorfismos (cercanos a los que las sondas detectan) que pueden afectar al correcto anillamiento y, por lo tanto, el rendimiento de las sondas. Para evitar la no hibridación o incluso un genotipo incorrecto debido a la existencia de estos polimorfismos adicionales en las zonas de anillamiento de las sondas, decidimos utilizar inosina en las posiciones nucleotídicas complementarias a estos polimorfismos adicionales. Una limitación valorada en el diseño del ensayo y plasmada en el manual de usuario es que no se pueden detectar polimorfismos adicionales no descritos en los sitios de unión al primer o en los sitios de unión de la sonda lo que puede producir resultados incorrectos. Durante el diseño se han consultado diversas bases de datos (<http://rhesusbase.info/>, <https://gnomad.broadinstitute.org/gene/ENSG00000187010>) donde están representados miles de individuos y no se han descubierto, en principio, variantes que pudiesen comprometer los resultados del test.

Además, a la hora de diseñar la sonda para el SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) responsable de la respuesta inmunológica, se trató, de manera general, de que estuviera posicionado en el centro de la secuencia de hibridación de la sonda. No obstante, si ello

## Discusión

conllevaba la formación de estructuras secundarias, se corrigió su localización hacia una posición más descentrada para evitar que el efecto de estas estructuras se tradujera en señales (MFI) inespecíficas. Y la última estrategia utilizada en el diseño de las sondas fue modificar su longitud (18-24 nucleótidos) en función de si era de interés mejorar su capacidad discriminadora u obtener una mayor señal de hibridación. Así, para una mejor discriminación entre los 3 clusters: homocigoto frecuente (AA), heterocigoto (AB) o homocigoto infrecuente (BB), se seleccionaron oligonucleótidos de menor tamaño porque con ello se consigue aumentar la especificidad. En cambio, con sondas más largas, que tienen más posiciones nucleotídicas donde potencialmente incorporar Biotin-11-dCTP en el proceso de marcaje, se obtienen mayores señales cuando se produce el "revelado" con la estreptavidina-ficoeritrina (SAPE) (Tabla 30). Un ejemplo de esto, fue los resultados obtenidos en el PS117 (Tabla 30) donde la diferencia en los valores de MFI entre los dos diseños testados, cuya única diferencia fue un nucleótido más, originó unas señales dos veces superior en la sonda de mayor tamaño (18 pb) respecto a la menor (17 pb). Por lo tanto, según cada PS como muestran los resultados [Tablas 25- 29 y Figuras 37-41] se fueron testados los distintos diseños con los requisitos anteriormente descritos hasta conseguir un valor de ratio cercanos a los teóricos (0: homocigoto infrecuente, 0.5: heterocigoto, 1: homocigoto frecuente) y unos valores MFI en las muestras heterocigotas  $\geq 3000$ .

Durante esta fase de optimización el componente PMM (conformado por: agua, primers, Biotin-11-dCTP, y PCR-buffer) la elección buffer de PCR ha sido un punto crítico a la hora de conseguir una amplificación específica del gen *RHD*. Los dos buffers testados fueron QIAGEN 10x PCR buffer (Buffer H) y el 2.05x QIAGEN multiplex custom buffer (Buffer Q). Si se observan los resultados (Figura 37) una de las diferencias entre ambos buffers debe ser la concentración de cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ). El Buffer Q genera productos inespecíficos correspondientes a la amplificación del gen *RHCE*. El cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) aumenta la temperatura de hibridación del ADN y su concentración resulta fundamental para optimizar la reacción de PCR. Sabemos que a altas concentraciones de  $Mg^{++}$  disminuye la especificidad de la PCR y, al contrario, a bajas concentraciones de  $Mg^{++}$  aumenta la especificidad, por lo que, el Buffer H al presentar una menor concentración de  $MgCl_2$ , resultó en reacciones más específicas, por ejemplo, como muestra la Figura 37, al amplificar el gen *RHD*.

El siguiente componente de la PMM optimizado fue el dCTP "caliente" (Biotin-11-dCTP), estrechamente relacionado con los valores mayores o menores de MFI y la estreptavidina-ficoeritrina (SAPE). Luminex utiliza dos láseres, el láser rojo que excita a los tintes fluorescentes internos de las microesferas, identificando cada una de las microesferas de acuerdo con su firma espectral; y el láser verde, que reconoce el marcador fluorescente, la estreptavidina-ficoeritrina (SAPE), cuya afinidad de unión es extremadamente alta con la biotina. La modulación de ambos reactivos nos ha permitido obtener una proporción de "señal específica" / "background" precisa

para que la discriminación entre los genotipos no se haya visto comprometida (Figuras 38-39). Este punto ha sido crítico hasta conseguir una discriminación óptima, pero nuestra experiencia previa en el desarrollo de los anteriores ensayos de genotipado (ID CORE XT e ID HPA XT) nos permitió precisar de manera más eficaz la proporción entre ambos componentes. Es por esto que, modulando el volumen de ficoeritrina-estreptavidina (SAPE) en muy pequeñas cantidades (microlitros) conseguimos cambios fundamentales en la señal (MFI).

En cuanto al componente BMM se optimizaron tanto los conjugados o couplings como el buffer de hibridación. En cuanto a los conjugados, los resultados obtenidos muestran que el punto decisivo para una mayor eficiencia en el proceso de conjugación, unión del grupo amino de la sonda al grupo carboxilo, está en el manejo del EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride). Es fundamental, por un lado, el tiempo que se tarda en adicionarlo y, por otro, la utilización de alícuotas de un único uso (Figura 43-44). Estos dos parámetros se fundamentan en un mismo factor común, la higroscopia de este reactivo, que tiende a producir un menor rendimiento en la reacción de acoplamiento entre los grupos carboxilos y los amino de las sondas. Y en cuanto al buffer de hibridación, se tuvo en cuenta que las múltiples variantes genéticas incluidas en el test conllevan utilizar de forma simultánea múltiples sondas y, por tanto, nos enfrentarnos a la problemática de garantizar unas temperaturas de fusión lo más similares entre ellas. Para ello se utilizó un buffer recomendado por Luminex cuyo compuesto principal es TMAC (Tetramethylammonium chloride) que ayuda a estabilizar los pares de bases AT y CG, minimizando el efecto de la composición de bases en la hibridación permitiendo utilizar mismas condiciones de hibridación pese a usarse sondas con temperaturas de fusión ligeramente diferentes.

Una vez diseñado el test en la siguiente fase se evaluó la robustez del proceso de fabricación del kit.

### FASE 2. Desarrollo del prototipo

En el proceso de fabricación del kit ID RHD XT se identificaron los parámetros críticos que pudiesen tener un impacto en la calidad del test, es decir, se definieron los controles de calidad tanto de los distintos componentes que conforman el test (PCR Master Mix (PMM), Bead Master Mix (BMM), SAPE y SAPE Dilution Buffer) como de los reactivos intermedios necesarios para su fabricación. Con los resultados empíricamente obtenidos en esta fase se determinaron los controles de calidad considerados como medidas preventivas para detectar cualquier error de fabricación o de materias primas defectuosas.

Los principales controles de calidad se pueden resumir en dos categorías: 1. Controles de calidad de las materias primas, es decir, teniendo en cuenta los parámetros que el proveedor define en su certificado analítico (CoA) hemos confirmado el cumplimiento de dichas especificaciones para

## Discusión

así evitar el uso de un material defectuoso; y 2. Controles de calidad de las materias intermedias, es decir, verificar que la fabricación de los distintos buffers o de los distintos procesos llevados a cabo se ha realizado de forma correcta y detectar así posibles errores antes de la conformación de un lote de ID RHD XT. La importancia en la determinación de los controles de calidad hace referencia al proceso de detectar errores analíticos dentro del laboratorio para asegurar la fiabilidad y exactitud de los resultados. Un pobre desempeño puede ocasionar genotipado erróneo, un tratamiento inadecuado del paciente, un incremento de costes e incluso unas repercusiones graves para el paciente por un resultado incorrecto. El error humano es algo que existe y hay que minimizarlo al máximo por eso cada punto esencial de un proceso o procesamiento debe estar ligado a un control de calidad y así minimizar al máximo los errores, de por sí muy bajos, pero existentes.

Algunos de los parámetros medidos en esta fase como las medidas de conductividad, pH y concentración son análisis rápidos y sencillos, y resultan valiosamente informativos. En estos casos, para cada parámetro analizado se definió un rango, que está detallado en el apartado de 'Resultados'. La importancia de los controles de calidad es un punto clave para asegurar una correcta fabricación. Con los controles de calidad no sólo establecemos unos estándares sino que se realiza un seguimiento de los mismos para conseguir una mayor calidad de los procesos. Así, por ejemplo, en la Tabla 49, se muestran los datos de conductividad del Buffer de Hibridación, existen unos valores (marcados en rojo) que no cumplen con la especificación definida (87.0 - 97.5 mS / cm). La causa podría deberse a que la materia prima (TMAC, componente principal utilizado en la fabricación de este buffer) fuese defectuosa, o a un error en la fabricación del reactivo. En este caso el origen se debió a un error durante su preparación ya que la misma materia prima se utilizó en otra fabricación y los valores de conductividad fueron correctos. Otro ejemplo de la importancia de los controles de calidad queda reflejado en otro resultado mostrado en la Tabla 53, al igual que antes, los valores de conductividad del buffer MES (utilizado durante el proceso de conjugación y esencial para la eficiencia del proceso de acoplamiento sonda-bead) detectaron dos fabricaciones fuera de la especificidad establecida, 145 – 198  $\mu$ S / cm. De igual manera el error en este caso fue durante su fabricación, pudiendo ser la causa multifactorial, bien como resultado de una pesada incorrecta del reactivo (el MES es un reactivo en polvo), un volumen de agua añadido incorrectamente, o una disolución inadecuada del MES, etc. A la vista de estos resultados vemos que los errores durante la fabricación existen, errores que hay intentar mitigar y además detectar, de ahí la importancia en desarrollar controles de calidad sensibles y robustos que pongan de manifiesto estos posibles fallos en cualquier punto de un procedimiento.

Otro ejemplo que nos ha mostrado la importancia de los controles de calidad ha sido la detección de una materia prima defectuosa en el SAPE. Su hallazgo fue por un fallo detectado en Luminex

donde se observaba una clasificación incorrecta de las beads. Tras varias investigaciones se descubrió la presencia de precipitados en el stock de la materia prima. En nuestro caso no era posible llevar a cabo el control de calidad que realizaba el proveedor, es decir, la cromatografía líquida de alta eficacia o *high performance liquid chromatography* (HPLC) (técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas) alternativamente pusimos en marcha un control de calidad de conteo de partículas mediante el Multisizer 3 Coulter counter (Beckman Coulter). Los resultados observados en la Tabla 63 (valores marcados en rojo) muestran como este control de calidad es sensible y capaz de detectar la presencia de partículas en un reactivo que debe estar libre de ellas. Por lo tanto, constituye una eficaz alternativa al HPLC.

Por lo tanto, esta fase del proyecto hemos querido poner de manifiesto la valía de los controles de calidad, además de su verificación continua mediante un seguimiento de las tendencias de los valores obtenidos en cada fabricación para cada una de las materias testadas. Según se vaya valorando estos datos de tendencia o en el caso de cambios de equipos involucrados en la producción de ID RHD XT, se estudiaría la necesidad de ratificar dichos criterios establecidos. Los resultados obtenidos en esta fase son fundamentales para la generación de un test de genotipado cuyo funcionamiento es correcto y, por tanto, cuya relevancia clínica está estrechamente relacionada con la toma de decisión llevada a cabo por el clínico en la rutina transfusional. En consecuencia, cualquier resultado inexacto conduciría a complicaciones en el paciente que afectan a su salud, por lo que es esencial realizar todo tipo de análisis que aseguren tanto los procesos como los procedimientos llevados a cabo hasta la obtención un ensayo cuya determinación del genotipado sea correcto.

A continuación, se discuten los resultados obtenidos en los distintos estudios realizados para obtener la aprobación de marcado CE de la UE

### FASE 3. Validación del test

Los resultados obtenidos en los estudios evidencian una serie de desviaciones causadas, en general, por errores realizados por el usuario. Un error relativamente común observado durante la ejecución de la PCR es la falta de adición del ADN en algunos de los 96 pocillos de la placa. Como medida correctiva simple pero eficaz se ha propuesto la comprobación visual de los volúmenes, es decir, que el operador compruebe visualmente que todos los pocillos presenten un volumen homogéneo. Esta medida es factible y sencilla, ya que la falta de adición de los 5 µL de ADN es visualmente perceptible (Figura 46).

Otro problema detectado son las posibles contaminaciones cruzadas entre muestras. Por ejemplo, en nuestro caso, en el tiempo '6 meses' del estudio de estabilidad real, la muestra "RH2\_L3\_T6\_R10" se contaminó con el control de procesamiento ID RHD CONTROL 1. Este es

## Discusión

un error común en los laboratorios, en particular cuando se procesan volúmenes grandes de muestras de manera simultánea. La medida correctiva propuesta ha sido el uso a la hora de la adición de ADN, de pipetas multicanales para así minimizar el posible error humano causado por el uso de pipetas monocanales, las cuales conllevan un uso más intensivo, mayor número de pasos y, por consiguiente, un mayor riesgo de equivocación. Otro error detectado fue durante la dispensación del producto amplificado en el paso de la hibridación. En este caso el volumen añadido fue menor del considerado como límite de tolerancia del protocolo (Figura 48, 49, 50). En esta ocasión, de nuevo, la sugerencia planteada ha sido que tras de la adición del producto amplificado en la etapa de la hibridación se confirmen que los volúmenes restantes en los pocillos de la placa de PCR sean uniformes

---

### Resumen de los estudios analizados

A pesar de estas desviaciones por diversos errores durante el procesamiento, si analizamos los resultados obtenidos en los diversos estudios relacionados con la estabilidad del kit (estudio de estabilidad real, estudio del vial abierto y estudio de estabilidad a temperaturas extremas) los resultados obtenidos en todos ellos fueron 100% correctos en los todos puntos de estabilidad examinados. Por lo que podemos asegurar que la estabilidad del test alcanza los 15 meses sin verse afectada su vida útil en la temperatura del almacenamiento analizada a 2-8°C periodo considerado relativamente extenso ya que otros test moleculares sólo alcanzan los 12 meses de estabilidad.

Otro apartado de interés en la validación de nuestro test reside en el análisis de los resultados obtenidos en los estudios de detección del límite inferior y límite superior. Recordemos que en estos estudios tratamos de definir el rango de concentraciones concentración de ADN *input* recomendado para garantizar *a priori* resultados 100% correctos. Los resultados definieron que el rango recomendado de uso estaba comprendido entre 2 y 200 ng/ $\mu$ L (10 y 1000 ng por reacción). La concentración del límite inferior es muy baja si se compara con los datos de concentración recopilados de diversas extracciones de ADN de sangre total poco eficientes cuyos valores alcanzaron los 7- 8 ng/ $\mu$ L. De manera que incluso con una extracción poco eficiente donde las concentraciones de ADN pueden ser bajas, esto no supone un problema limitante para el correcto genotipado de las muestras. Esto supone una gran ventaja frente a otras tests donde recomiendan que la cantidad mínima de ADN debe ser mayor o igual a 15 ng/ $\mu$ L (Immucor, 2014). Consideremos ahora, el límite superior (200 ng/ $\mu$ L), hay que mencionar que este estudio no se iba a realizar en un primer momento, pero se llevó a cabo sin embargo por recomendación de la FDA (*Food and Drug Administration*), la agencia del gobierno de los Estados Unidos responsable de la regulación, entre otros, de los derivados sanguíneos. Su recomendación fue para el test que estaba siendo evaluando en ese momento, ID CORE XT (Progenika Biopharma, a Grifols Company) de genotipado de 10 grupos sanguíneos, test que ya

## Discusión

hemos mencionado con anterioridad. La argumentación de la FDA es que se debe acotar al máximo cualquier error en un test de diagnóstico y para ello, en este caso, se debe definir un límite superior de concentración de ADN. Tras la verificación de que a una concentración de 200 ng/μL (concentración seleccionada en función de las concentraciones de ADN genómico humano (extraído de sangre total) utilizadas en Progenika Biopharma. A Grifols Company) los resultados en todas las muestras fueron 100%, esta información quedó recogida en el manual de usuario. Con los kits de extracción de ADN validados en para este ensayo [QIAamp Blood Mini Kit o QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)] concentraciones superiores a 200 ng/μL se han obtenido en muy contadas ocasiones (menos del 1%) y en todos los casos, los resultados fueron correctos. Además, en el manual de usuario se recomienda usar estos kits de extracción por lo que si se utilizan otros métodos extracción cada usuario debe hacer su propia validación.

Igualmente, relevante ha resultado evaluar la susceptibilidad de ID RHD XT a diversas sustancias interferentes de uso común en este ámbito. Así, se evaluó el posible impacto de sustancias endógenas y exógenas en el contexto de las necesidades médicas. Las sustancias interferentes endógenas utilizadas reproducen los estados de hemólisis, ictericia y lipemia en muestras de sangre. Y las sustancias exógenas analizadas se eligieron basándonos en el uso previsto del test en la población, es decir, sangres con presencia de medicamentos antiinflamatorios, anticoagulantes, antibióticos, etc. En el PS 117 (HPA-1) se observó que con el **interferente hemoglobina** (concentración probada 667 mg /dL) hubo un resultado de "No Call", por baja intensidad de señal, para una de las 3 réplicas de la muestra S3. Muestra cuyos fenotipos esperados eran, "D -" para el grupo Rh y "+" para la HPA-1a, y "0" para la HPA-1b. Además, una réplica de la **muestra sin interferente**, mostró un resultado "No call" para HPA1 por baja señal. Se realizó un gel de agarosa y se observó un patrón de banda distinto en la réplica 1 en comparación con la réplica 2 y 3 (Figura 65). Se repitió la PCR con la muestra S3\_R1 en las mismas condiciones y también diluyéndola a la mitad con agua. Los resultados de los fenotipos predichos fueron correctos sólo en la muestra diluida. A la vista de estos resultados nos planteamos dos hipótesis a investigar: 1.- la hemoglobina como posible interferente [se añadió hemoglobina comercial a las muestras de sangre antes de su extracción examinado la concentración de 500 mg / dL (previamente testada) y 1000 mg / dL] y 2.- la hemoglobina junto con la posible hemólisis producida por el tiempo de almacenamiento de las sangres antes de realizar su extracción de ADN. El grupo hemo de la hemoglobina puede estar presente enlazado al ADN extraído, es uno de los más importantes inhibidores de la PCR (Brynes *et al.*, 1975; de Franchis *et al.*, 1988; Akane *et al.*, 1994). Su capacidad quelante de los iones metálicos produce el secuestro del magnesio, necesario para el correcto funcionamiento de la Taq polimerasa. Los estudios realizados, mediante espectrofotometría de varios compuestos que contienen el grupo hemo, sugieren que el inhibidor es un producto de la digestión de la hemoglobina produciendo la

## Discusión

liberación del hierro del grupo hemo de la sangre con proteinasa K. Dicho producto no se aísla completamente por parte de los solventes orgánicos y coprecipita con el ADN.

Los resultados de esta investigación nos hacen descartar como única causa la concentración de hemoglobina como interferente, pero considerar en cambio la combinación de ambas condiciones (tiempo de almacenamiento y concentración de hemoglobina) ya que al cabo de 7 semanas a 2-8°C, las muestras de sangre cuyo fenotipo era D negativo se vieron afectadas (Figura 66) produciendo una MFI menor en el PS 117 lo que conllevó a resultados de “No Call” en alguna de las muestras. En consecuencia, en el manual de usuario se incluyó una advertencia que decía que el tiempo máximo de almacenamiento de las muestras de sangre hasta la extracción de su ADN no debía ser superior a 4 semanas. El ensayo ha sido validado para usarse con ADN genómico humano extraído de sangre total anticoagulada con EDTA, utilizar otro ADN de otro origen, por ejemplo saliva, implicaría que el usuario debería hacer sus propias validaciones y confirmar que los resultados del test no se ven comprometidos de ninguna manera.

A continuación, se evaluó la precisión y la reproducibilidad, estudios realizados independientemente, pero que están estrechamente correlacionados. Como objetivo se valoró la exactitud del método de medida en condiciones de variabilidad (días, lotes de reactivos de ID RHD XT, equipos y operadores) y, por otro lado, se valoró la repetitibilidad de los resultados para las mismas muestras y el mismo test pero realizado en diferentes laboratorios (estudio de reproducibilidad). Los resultados de precisión demostraron la baja variabilidad entre los parámetros testados (<20%) lo que confirma la exactitud en los resultados del test. Y, en cuanto a la reproducibilidad del test, ésta ha quedado demostrada con los resultados correctos en todos los laboratorios participantes. Por consiguiente, se puede afirmar que ID RHD XT demuestra una precisión y reproducibilidad aceptable entre sitios, operadores, días, lotes de reactivos y concentraciones de ADN lo que pone de manifiesto la solidez de los resultados de genotipado obtenidos mediante el test.

Hay que mencionar, además, uno de los estudios que mayor información nos ha dado sobre la tolerancia a la variabilidad en el protocolo es el estudio Guard Banding. La importancia de realizar este estudio radica en que valora la capacidad de variación permitida con nuestro protocolo para antepoñernos lo máximo posible ante cualquier posible error durante el procesamiento del test que conllevara a un genotipado incorrecto. En este estudio se han valorado múltiples aspectos del protocolo desde tiempos de agitación, volúmenes, temperaturas, etc. Lo que buscamos en todos los casos es modular las condiciones nominales del protocolo en cualquiera de sus etapas (Amplificación, Hibridación, Marcaje y Adquisición de datos) y delimitar lo que se considera aceptable de lo que no. Los resultados obtenidos en todas las condiciones fueron 100% correctos razón por la que se consolida la robustez del protocolo frente a las variaciones analizadas en

## Discusión

cada una de los pasos del proceso. En consecuencia, el ensayo ID RHD XT es fiable, seguro y robusto en sus resultados permitiendo tener bajo control los posibles errores que el usuario pueda cometer dentro de los límites testados.

El siguiente punto trata de la evaluación del rendimiento del test. Para ello, hemos llevado a cabo dos estudios: 1. Evaluación del rendimiento del test a partir de muestras individuales (*Performance evaluation of individual samples*) y 2. Evaluación del rendimiento del test a partir de mezclas de muestras de sangre y de ADN (*Performance evaluation of pooled donor samples*).

En el primer estudio se examinó el funcionamiento de ID RHD XT en comparación con dos métodos de referencia, serología y secuenciación bidireccional (BDS). Se testaron un total de 1000 muestras distribuidas en muestras procedentes de donantes, pacientes y recién nacidos. Además, teniendo en cuenta el uso previsto del ensayo, se ha incrementado el número de muestras fenotipadas por serología como *weak D* con el fin de validar el correcto funcionamiento del test con estas muestras específicas.

La serología no puede distinguir ni los subtipos *weak D* y ni los *partial D* (Sandler *et al.*, 2015). Las variantes *weak D* muestran una expresión del antígeno D baja o muy baja, pudiendo causar su incorrecta clasificación como falsos negativos. Ante esta posible clasificación errónea la práctica rutinaria consiste en considerar a esos **pacientes** como RHD negativos, lo cual tiene las siguientes implicaciones: 1. el consumo innecesario en medicina transfusional de unidades de sangre y hemoderivados Rh negativas y 2. el empleo innecesario de la terapia preventiva con inmunoglobulina anti D. Es por esto que el genotipado de *RHD* puede superar esta limitación inherente en la serología, lo que contribuye a reducir la profilaxis anti-D durante el embarazo, y también evita el uso inapropiado de unidades de sangre D negativas (Denomme *et al.*, 2007; Nance *et al.*, 2013). De manera que el genotipado de los *weak D* contribuye a preservar la baja disponibilidad de las unidades de sangre D negativas debido a la ausencia de donantes con este fenotipo. Así como el uso superfluo de la profilaxis anti-D que puede conllevar a problemas asociados a la incompatibilidad sanguínea durante el embarazo, como a su elevado coste y a una serie de cuestiones éticas asociadas a su producción por su origen humano en gestantes que en realidad no precisarían dicha terapia.

En el estudio las muestras procedentes de España de donantes serotipados como *weak D* fueron genotipadas con el test y alrededor de un 53% resultaron *weak D* tipo 1, 2 o 3. Además, se detectaron 9 discrepancias (Tabla 59), clasificadas como D negativas por serología, y genotipadas como “*weak D types 1, 2 or 3 not detected*” (*RHD gene present. D- (RHD\*DIIIa-CE(3-7)-D or RHD\*Pseudogene genotype not detected*) con ID RHD XT. Estas discrepancias están causadas por la presencia de otras variantes no incluidas en el ensayo ID RHD XT, por lo tanto, se puede afirmar que es una limitación inherente al ensayo (Progenika, 2019). La

## Discusión

estimación de la frecuencia de la generación de un resultado incompleto (no ser capaz de determinar la variante) está muy ligado con cada población. Así, en la población de origen europeo los genotipos más frecuentes como los D negativos (*RHD deletion*) y los weak D tipo 1, 2 y 3 están representados en el test, igualmente ocurre con los genotipos más frecuentes que originan un fenotipo D negativo en la población africana o afroamericana (*RHD\*ψ* (*RHD\*Pseudogene*) y el alelo híbrido *RHD\*DIIIa-CE (3-7)-D*). La limitación viene representada por la ausencia de variantes que determinen los fenotipos Del, frecuentes en la población asiática.

Estas muestras discrepantes, por ser variantes no incluidas en el ensayo, se investigaron con otro método molecular, BLOODchip® Reference (Progenika Biopharma), y se determinó que tres muestras eran variantes Del, una muestra era *weak D* o Del y cinco muestras con variantes cuyo fenotipo es D negativo. ID RHD XT el resultado de genotipado que determina para estas 9 muestras es *weak D types 1, 2 or 3 not detected*" (*RHD gene present. D- (RHD\*DIIIa-CE(3-7)-D or RHD\*Pseudogene genotype not detected*) mensaje que hace referencia a los tres alelos interrogados por el ensayo y que no están presentes en las muestras. Con este resultado estas muestras deben tratarse en pacientes como D negativos y en donantes como D positivos. A pesar de que BLOODchip® Reference (Progenika Biopharma), es un método molecular más completo por el número de variantes que detecta, la tecnología ha quedado obsoleta y no cumple con la normativa regulatoria de la UE y, por lo tanto, no es posible utilizarlo como un método de referencia para el diagnóstico clínico. Debido a esto y valorando factores como la robustez de la tecnología Luminex en el campo del diagnóstico clínico se decidió crear una familia de tests de genotipado sanguíneo (ID CORE XT, ID HPA XT e ID RHD XT) con esta tecnología. Es verdad, que para el genotipado de Rh sólo se pensó en aquellas variantes que no generaban respuesta inmunogénica y lo que puede conllevar a una limitación del ensayo.

**Tabla 59. Discrepancias entre los resultados de serología, los resultados obtenidos con ID RHD XT. Uso de método molecular alternativo, BLOODchip reference, para resolverlas.**

ID RHD XT predicted phenotype result	Samples (n)	Serology result	Reference methods		Samples (n)	Discrepancy rationale
			BLOODchip® reference genotype	BLOODchip® reference predicted phenotype		
Weak D types 1, 2 or 3 not detected <sup>a</sup>	9	D-	<i>RHD(IVS3 + 1G&gt;A)Del</i>	Del	1	Variant not interrogated
			<i>RHD (1-9)-CE(10)</i>	Del	1	Variant not interrogated
			<i>RHD 94insT(FS, 35X)</i>	Del	1	Variant not interrogated
			<i>RHD 361del11nt</i>	RHD-	4	Variant not interrogated
			<i>RHD*952<sup>b</sup></i>	RHD- <sup>b</sup>	1	Variant not interrogated
Weak D type 3	3	D+	<i>RHD (M295I) Del/w11</i>	Weak D (cDe)/Del (CDe) <sup>c</sup>	1	Variant not interrogated
			<i>Weak D type 3</i>	Weak D	3	Serology limitation
			<i>RHD (M295I) Del/w11</i>	Del	1	Variant not interrogated
Weak D types 1, 2 or 3 not detected <sup>a</sup>	61	Weak D	<i>DAR/weak D type 4-2</i>	Partial D	1	Variant not interrogated
			<i>DMH</i>	Partial D	1	Variant not interrogated
			<i>DMV</i>	Partial D	1	Variant not interrogated
			<i>Apparently non-negative</i>	RHD+	6	Unresolved
			<i>hom IVS5-38del4-'Apparently non-negative'</i>	RHD+	11	Unresolved
			<i>Weak D type 59</i>	Weak D	27	Variant not interrogated
			<i>RHD (M295I) Del/w11</i>	Weak D	1	Variant not interrogated
			<i>Weak D type 4</i>	Weak D	9	Variant not interrogated
			N/A	N/A	3	N/A
			N/A	N/A	1	N/A
No amplification variant detected <sup>a</sup>	3	Weak D	<i>DM type II</i>	Partial D	2	Variant not interrogated
			N/A	N/A	1	N/A

N/A: Not available.

<sup>a</sup>RHD gene present. D- (*RHD\*DIIIa-CE(3-7)-D* or *RHD\*Pseudogene* genotype) not detected.

<sup>b</sup>RHD exons 1-10 BDS result.

<sup>c</sup>cDe or CDe haplotype not known.

Además, hubo 64 muestras cuyos resultados con ID RHD XT no pudieron ser comparados con la serología por dos motivos. El primero motivo hizo referencia a una limitación asociada a la propia serología, ya que no es capaz de discernir entre subtipos weak D. Se detectaron 3 muestras genotipadas como *Weak D Type 3* y la serología las había clasificado como D+. Y el segundo motivo se debió, de nuevo, a la presencia de variantes no determinadas por ID RHD XT, siendo su resultado *weak D types 1, 2 or 3 not detected* (*RHD gene present. D- (RHD\*DIIIa-CE(3-7)-D or RHD\*Pseudogene genotype not detected*), y por tanto, no se pudo comparar su fenotipo ni con la serología (Tabla 59) ni tampoco se pudo comparar los genotipos obtenidos de BLOODchip® Reference (Progenika Biopharma). Dicho lo anterior, destacar la frecuencia tan elevada de la variante *weak D type 59* en las muestras de España (16.9%), coincidente con publicaciones encontradas (Garcia-Sanchez *et al.*, 2011), y no incluida en el test porque como se ha mencionado sólo se incluyeron las variantes weak D que no generan respuesta inmunogénica, por lo tanto, se consideran a efectos transfusionales como D positivas. No obstante, en futuras versiones se valoraría la inclusión de variantes ahora descartadas en esta versión.

Asimismo, hay 17 muestras que no se pudieron resolver, aunque por serología fueron determinadas como weak D y fenotipadas como D+ tanto con ID RHD XT como con Bloodchip

## Discusión

Reference. El análisis de todas ellas con Bloodchip Reference dio como resultado que 11 de ellas presentaban el polimorfismo *RHD\*IVS5-38del4* cuyo fenotipo es Del y no D+ como dice el test, estas muestras habría que secuenciarlas para llegar a una conclusión y poder discriminar el porqué de ese resultado como fenotipo RHD positivo con ambos ensayos moleculares. Las otras 6 muestras no se pudieron determinar su variante. Los resultados obtenidos por serología como weak D pueden deberse a otros polimorfismos no incluidos en el test utilizado de referencia, Bloodchip Reference, o a variaciones en el gen *RHCE* o cualquier tipo de modificación postranscripcional o postraducciona.

A la vista de los resultados, ID RHD XT evalúa no sólo la determinación correcta de los weak D type 1, 2 and 3 (genotipados como D+ tanto en pacientes como en donantes), sino también la determinación correcta de otra *weak D* o *partial D*, variantes determinadas por ID RHD XT como “*weak D types 1, 2 or 3 not detected*” (genotipados como D- para pacientes y D+ para donantes).

Por lo tanto, todas las discrepancias de RhD anteriormente explicadas se consideran resultados aceptables para el objetivo de este estudio, aunque es cierto, que puede considerarse una limitación para otros usos previsto de ID RHD XT. Teniendo en cuenta que la frecuencia en la población de origen europeo de los fenotipos weak D es del 0.2-1% (Haer-Wigman *et al.* 2013; Wagner *et al.* 2009) de los que en el 90-95% de los casos encontrados corresponden con los weak D tipo 1, 2 o 3 (Flegel, 2011) determinadas por ID RHD XT. Además de la frecuencia de los fenotipos D parcial es menos del 1% (Flegel *et al.*, 2002, Muñiz *et al.*, 2012a) y de los fenotipos Del es menor 0.1% (Gardener *et al.*, 2012) por lo que las ocasiones en que ID RHD XT no va a poder determinar los genotipos y, por tanto, sus fenotipos asociados son bajas.

Una posible limitación del test está en los subtipos raros como *weak D type 1.1* y *weak D type 1.2* que se clasificarían como *weak D type 1* variantes que pueden generar anti-D (McGowan *et al.*, 2017; Raud *et al.*, 2017). La variante *weak D type 1.1* presenta dos cambios (52C>G y 809T>G) y la variante *weak D type 1.2* (809T>G y 712G>A) y nuestro test para determinar la variante *weak D type 1* utiliza el cambio 809T>G, por lo tanto, clasificaría a estos dos subtipos incorrectamente como *weak D type 1*. Estas dos variantes son muy raras y localizadas en un área del Norte de Alemania (Doescher *et al.*, 2005) encontrándose un caso de 22.000 donantes (Christiansen *et al.*, 2008) y, por tanto, considerarse unos casos despreciables.

En cuanto al sistema HPA-1, a modo recordatorio, los anticuerpos HPA-1a son los aloanticuerpos plaquetarios más frecuentemente detectados en la práctica clínica, y son los causantes del 85% de los casos de trombocitopenia aloinmune del feto y del neonato (TAIFN) confirmados serológicamente (Curtis *et al.*, 2014). Los resultados correctos obtenidos con ID RHD XT y comparados con la secuenciación bidireccional nos indican que la especificidad y sensibilidad ha sido del 100% y que las frecuencias observadas son similares a las encontradas en la literatura

## Discusión

en la población de España (Muniz-Diaz *et al.*, 1993). En consecuencia, la principal ventaja en la determinación de HPA-1 en embarazadas reduciría la morbilidad y mortalidad causadas por trombocitopenia aloinmune del feto y del neonato (TAIFN).

Y, por último, la evaluación del rendimiento del test a partir de mezclas de muestras de sangre y ADN (*Performance evaluation of pooled donor samples*). Para confirmar a los donantes RHD negativos se requiere realizar de varias pruebas serológicas con las limitaciones que sabemos que puede conllevar. Dicho lo anterior, consideramos otro uso que darle al test ID RHD XT para la identificación de una manera rápida y coste-eficiente de los donantes D negativos. En este estudio la utilidad del ensayo se pensó como herramienta de *screening* en pools de muestras de donantes serológicamente D-C/E+.

Aunque la causa más frecuente de los fenotipos D- se debe a la delección completa del gen *RHD*, lo que representa el 15% de los fenotipos D negativos en la población de origen europeo, existen algunos individuos con una expresión de su proteína RhD nula o muy débil, pero con presencia de fragmentos del gen *RHD* (Daniels, 2013a). Como hemos ido mencionando a lo largo del proyecto, en estos casos, los métodos serológicos estándar no pueden distinguir las variantes D con una cantidad reducida o expresión parcial de antígeno D. Afortunadamente, métodos o plataformas alternativos, como es el caso ID RHD XT, puede complementar esa deficiencia y ser herramientas útiles en la rutina clínica de los bancos de sangre.

Con este estudio se evalúan dos objetivos, por un lado, en las muestras de sangre se valida el ensayo de genotipado ID RHD XT para ser utilizado como una herramienta para el análisis de pools de muestras D-C/E+. Y, por otro lado, en las muestras de ADN serotipadas C/E+ y previamente genotipadas por los centros se utilizaron para validar la precisión del ensayo cuando se utilizan muestras con presencia de variantes *RHD* en pools. En ambos casos el genotipado de *RHD* usando muestras agrupadas es una estrategia para analizar una gran cantidad de muestras a un coste razonable.

El número total de muestras analizadas fueron 1000 englobadas en un total de 87 pools (31 pools de sangre (387 sangres) y 56 pools de ADN (613 ADNs), formadas por hasta 20 muestras distintas. Un total de 924 muestras en pools se resolvieron con el test ID RHD XT lo que supone un 92.4% (924 muestras) el 7.6% (76 muestras) restante hubo que analizarlas mediante NGS ya que esas muestras presentaban variantes no interrogadas por ID RHD XT por lo que no se les podía asignar un fenotipo. El 7.6% puede parecer un porcentaje elevado pero hay considerar dos aspectos ventajosos: 1. las muestras se evalúan en pools, por lo tanto, desde un aspecto económico y sabiendo que los métodos moleculares son más caros que la serología esto supone un ahorro ya que en un único pocillo se puede procesar hasta 20 muestras a la vez y 2. hay que remarcar que la premisa de este estudio “muestras D-C/E+”, es decir, que recordando la

## Discusión

complejidad del sistema Rh sabemos que los procesos de conversión génica son más probables en este tipo de haplotipos. Por lo que llegados a este punto el 7.6% no es un porcentaje “real” de lo que ocurrirá en la rutina clínica donde los pools de muestras D negativos se harán sin esta preselección.

Volviendo al tema que nos ocupa, de este 7.6% se determinaron 43 muestras cuyo fenotipo es D negativo. La variante más frecuente (31.6%) encontrada es *RHD\*Ce(3-9)* (24 muestras), lo que concuerda con datos bibliográficos anteriores que dicen que esta variante representa aproximadamente el 27-30% de los alelos positivos para el gen *RHD* en antígenos D negativos (Wagner *et al.*, 2001). La siguiente variante detectada ha sido *RHD\*952T* (22.4%) presente en 17 muestras, esta variante se describe por primera vez en donantes de la población alemana cuyo fenotipo es negativo y está asociado al haplotipo CDe (Flegel *et al.*, 2009), el exón 7 de *RHD* presenta una mutación que origina un codón stop prematuro produciendo una proteína truncada de 317 aminoácidos de longitud (Christiansen *et al.*, 2010). Y el último fenotipo D negativo fue la variante *RHD\*1007A* encontrada en dos muestras. Esta variante produce una mutación sin sentido Gly336Asp.

Los siguientes resultados obtenidos fueron muestras cuyo fenotipo era Del (16 muestras). Los fenotipos Del son aquellos cuya proteína habitualmente “normal” se expresa a muy bajos niveles y cuyo gen *RHD* suele estar íntegro, lo que no debe confundirse con un fenotipo D negativo causado por la delección completa del gen *RHD* (lo que se suele representar como dd o D-). Hay que recordar que si se transfunde sangre mal serotipada como D negativo siendo realmente un fenotipo Del, éstos individuos están en riesgo de desarrollar aloinmunización anti-D (Nuchnoi *et al.*, 2014).

La variante más frecuente encontrada en este grupo es *RHD\*weak D type 11* (11 muestras) esta variante está asociada a dos haplotipos con fenotipos distintos. En los haplotipos cDe, aparece como *weak D* detectable mediante la prueba de aglutinación indirecta. En el haplotipo CDe, la densidad del antígeno es mucho menor y el fenotipo está al límite de un *weak D* y, por lo tanto, se considera fenotipo Del (Körmöczí *et al.*, 2005). Nuestras muestras presentan este haplotipo CDe por lo que son Del. En estas 11 muestras Del, dos de ellas las consideramos discrepancias ya que el fenotipo reportado por parte de los centros (Milán y Bolonia) fue D negativo. La siguiente variante Del hallada en dos muestras fue *RHD\*IVS3+1G* causante de aloinmunización anti-D (Körmöczí *et al.*, 2005), además, una de las muestras perteneciente a Bolonia, es una discrepancia ya que el fenotipo determinado por el centro fue D negativo. Esta variante Del sólo ha sido descrita en la población caucásica con una frecuencia de 1:1800 individuos (0.05%). En nuestro estudio el porcentaje ha supuesto un 0.2% pero hay que tener en cuenta que ha habido una preselección por parte de los centros de las muestras enviadas. En cuanto al resto de variantes Del, *RHD\*93-94insT* determinada en una muestra y causada por una *frameshift*

## Discusión

*mutation*, es decir, una mutación que origina un desplazamiento en el marco de lectura, en este caso origina un codón stop en la posición 35 del exón 1 de *RHD* (Müller *et al.*, 2008). La siguiente variante, también encontrada en 1 muestra, *RHD\*147delA*, causada igualmente por una *frameshift mutation* en el exón 1 de *RHD* produciendo la delección de la posición 147 A (Flegel *et al.*, 2009). Y la última variante Del, determinada también en una muestra, es *RHD\*weak D type 61* asociada al haplotipo CDe, característico de la población euroasiática. Se caracteriza por ser un “single missense mutation” produciendo un codón que codifica un aminoácido distinto (Arg>Trp).

El siguiente grupo de muestras se clasificaron como fenotipo weak D. Para las muestras de ADN los centros nos enviaron el genotipado de las muestras. Este fenotipo es el más común de los fenotipos poco frecuentes asociados al sistema Rh en la población caucásica europea, con una frecuencia de entre el 0.2 y el 1% (Haer-Wigman *et al.* 2013; Wagner *et al.* 2009) y está asociado a un haplotipo DCe o DcE (inusual) (Brecher, 2005). Se determinaron muestras *Weak D type 1*, 2 y 3 con ID RHD XT cuyos resultados fueron coincidentes con la referencia enviada por cada centro. Se encontró una discrepancia en una muestra de sangre cuyo resultado en pool e individual fue *RHD\*Weak D Type 2*. Esta muestra fue enviado fenotipada como D negativo y hay que recordar que este **donante** a efectos transfusionales debe considerarse como D positivo, y por tanto, esta incorrectamente clasificado. Además, hubo otra discrepancia en otra muestra de sangre serotipada como D negativa y que se determinó mediante NGS que era *RHD\*Weak D Type 78*, igualmente el tratamiento de este donante debe ser el mismo, es decir, como D positivo. Hay que mencionar que ambas muestras pertenecen al mismo centro en Bolonia. La última variante, determinada con NGS, fue *RHD\*Weak D Type 5* cuyo resultado coincide con el enviado por el centro. Ambas variantes *Weak D Type 5* y *Weak D Type 78* tienen asociado el haplotipo CDe y son características de la población euroasiática. Ambas son “single missense mutation” produciendo un codón que codifica un aminoácido distinto, Ala>Asp en *Weak D Type 5* y Phe>Val en el *Weak D Type 78* (<http://www.rhesusbase.info/>).

Y, por último, variantes nuevas encontradas con NGS de las que no se puede conocer su fenotipo pero de las que podemos decir que los resultados obtenidos provenían de muestras D negativas: 4 muestras *RHD\*del(1-5)*, 2 muestras *RHD\*1151G*, 3 muestras *RHD\*IVS3+1G*, 1995A, 1 muestra *RHD\*156delA*, 241T, 2 muestras *RHD\*Ce* (361A, 3-9), 2 muestras *RHD\*346-354del*, 1 muestra *RHD\*Ce* (3-8). El beneficio para la práctica clínica de lo anteriormente descrito ha implicado la detección de 1.3% de muestras mal clasificadas por parte de la serología cuya reclasificación permite evitar nuevos casos de aloinmunización.

## Discusión

Teniendo en cuenta todos estos resultados también hay comentar las limitaciones de diseño que presenta el test, como son: 1.- La incapacidad de detectar variantes descritas, pero no incluidas en el test (como los resultados, anteriormente explicados, mostrados en los estudios de la evaluación del test), pero que puedan afectar a la expresión de los antígenos testados (**falsos positivos**). En el caso de pacientes siempre se les administraría sangre D negativa ante cualquier duda posible, y en el caso de donantes, siempre es mejor clasificar la sangre como positiva para evitar posibles casos de aloinmunización, aunque como hemos visto existen. Y 2.- la presencia de mutaciones en los *primers* o en las sondas que afecten a la correcta funcionalidad del producto (**falsos negativos**), limitación que hay que tener en cuenta, pero cuya probabilidad es baja por ser un test de detección múltiple y que el comportamiento de todos los probes (movimiento de *clusters*) puede ayudar a darnos pistas del funcionamiento del test. Además, recordamos que tenemos la zona llamada de *No call* (resultado indeterminado) que también nos sirve a modo informativo de lo que podría estar sucediendo. Aún así, hay que considerarlo como una limitación.

Con estas acotaciones inherentes al propio test se plantea, en aquellos resultados positivos para el gen *RHD*, pero no concluyentes por ser variantes no descritas por ID RHD XT, su análisis mediante NGS. Esta herramienta no es el objetivo de este trabajo, pero si se podría plantear como una plataforma que ofrecemos como apoyo para resolver aquellas muestras no concluyentes con el test. Es decir, detectar polimorfismos descritos no incluidos en el test de genotipado e incluso polimorfismos desconocidos (McBean *et al.* 2014; Lane *et al.* 2016; Liu *et al.* 2014).

En definitiva, a la vista de los resultados en donde ID RHD XT cumple con todos los criterios de calidad establecidos y, además, los resultados obtenidos en los estudios de verificación han sido positivos, por lo que se puede afirmar que el ensayo de genotipado es preciso y fiable. Es un test con doble utilidad en **pacientes** como método para predecir los genotipos y fenotipos de alta prevalencia D negativos, así como los *weak D type 1, 2 y 3* y los antígenos HPA-1a y HPA-1b y en **donantes** como una potencial herramienta para el screening en pool de muestras D negativas.

Llegados a este punto podemos recomendar su implementación como un ensayo complementario a la rutina clínica de los bancos de sangre.

## Conclusiones

1. Con este trabajo se evidencia que el genotipado es un proceso muy útil en la determinación del grupo sanguíneo RhD, especialmente en aquellos casos en los que la serología induce a resultados falsos negativos, debido a sus limitaciones de especificidad y sensibilidad para detectar la presencia de antígenos nulos o débiles.
2. La detección de las variantes *weak D* (tipo 1, 2 y 3) incluidas en el test, permite identificar a estos individuos a efectos transfusionales como RhD positivos, por lo que concluimos que el test genético ID RHD XT puede suponer un ahorro del 2.4 al 5% de las unidades de sangre D negativas, tan valoradas por los bancos de sangre.
3. Asimismo, la inclusión de variantes del sistema plaquetario HPA-1 ayuda a detectar simultáneamente un posible riesgo de trombocitopenia neonatal aloinmune (TNAI) por incompatibilidad en gestantes HPA-1a negativas. Por lo tanto, concluimos que el test ID RHD XT puede ayudar a evitar la formación de aloanticuerpos contra HPA-1a lo que representa una mejora apreciable de la calidad de la medicina transfusional.
4. Con el diseño del test genético basado en la tecnología “Luminex®” se ha conseguido un análisis múltiple y simultáneo, que permite obtener los genotipos / fenotipos predichos de las muestras en pocas horas. De igual modo, se ha logrado, que la productividad del test, desde su desarrollo en el laboratorio hasta su escalado industrial sea reproducible y robusta. Además, la sensibilidad test ha quedado patente tanto en pacientes (muestras individuales) como en el *screening* de donantes D negativos (mezcla de muestras) mediante la detección de variantes genéticas asociadas a la ausencia y presencia débil del antígeno D. En conclusión, el ensayo ID RHD XT es un método preciso y fiable para predecir los genotipos y los fenotipos D negativos de alta prevalencia, los *weak D* tipo 1, 2 y 3 y los antígenos plaquetarios HPA-1a y HPA-1b lo que garantiza su finalidad como test de diagnóstico *in vitro*.

## Bibliografía

Agencia española del medicamentos y productos sanitarios (AEMPS). (2018). Guía de normas de correcta fabricación de la unión europea. Medicamentos de uso humano y uso veterinario. Recuperado de: <https://www.aemps.gob.es/industria/inspeccionNCF/guiaNCF/home.htm#intro>

Alfonso Valdés, M. E., Eduardo, M., Bencomo Hernández, A., López de Roux, M, del R., Cruz, F., Lam, R. M., Graña, G. (2006). Aloinmunización contra células sanguíneas en el primer trimestre del embarazo. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 22(2).

Akane A, Matsubara K, Nakamura H, Takahashi S, Kimura K. (1994). "Identification of the heme compound copurified with DNA from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification". *J. Forensic Sci.* Vol. 39, No. 2, pp: 362-372.

Angeloni S., Cordes R., Dunbar S., Garcia C., Gibson G., Martin C., Stone V. (2018). *xMAP® Cookbook. A collection of methods and protocols for developing multiplex assays with xMAP Technology.* Luminex. 4rd Edition.

Araujo, F., Rodrigues, M.-J., Monteiro, F., Chabert, T., Tavares, G., Sousa, G., Guimaraes, J.-E. (2006). Weak D type 2 is the most prevalent weak D type in Portugal. *Transfusion Medicine*, 16(1), 63-67

Avent ND, Reid ME. (2000). The Rh blood group system: a review. *Blood* 95: 375-387.

Avent N. (2001). Molecular biology of the Rh blood group system. *J Pediatr Hematol Oncol* 23:394-402.

Balbuena-Merle R., Curtis S.A., Devine L., Gibb D.R., Karafin M.S., Luckey C.J., Tormey C.A., Siddon A.J., Roberts J.D., Hendrickson J.E. (2019). Red blood cell alloimmunization is associated with lower expression of FcγR1 on monocyte subsets in patients with sickle cell disease. *Transfusion* 00;1–9.

Bangham J. (2014). Writing, printing, speaking: Rhesus blood-group genetics and nomenclatures in the mid-twentieth century. *British Society for the History of Science* 47:335-61.

Baptista-Gonzalez H. (2005). El sistema Rh, una mirada a fondo. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 43(1):3-8.

Bastos C.F. Inmunología del glóbulo rojo y pruebas pretransfusionales. (2012). En A.Cortés Buelvas, M. Muñoz Gómez, S. Jaramillo Velásquez (coords.). *Aplicaciones y práctica de la Medicina Transfusional (Tomo I)* (pp.255-317). Santiago de Cali, Colombia.

Bencomo-Hernández A.A., E. Alfonso-Valdés M.E. (2010). Detección de anticuerpos IgA e IgM en la prueba de antiglobulina (Coombs). *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia.* 26(4)341-344.

Borrell A. (2014). Guías Clínica Isoinmunización. Unidad Clínica de Hematología Fetal, Area de Medicina Fetal, Servicio de Medicina Materno-Fetal. Institut Clínic de Ginecologia, obstetrícia i Neonatologia, Hospital Clínic de Barcelona. 1-10.

Brecher ME. (2005). *Technical Manual. The Rh System.* 15th ed. Bethesda MD: American Association of Blood Banks; 14: 315-334.

## Bibliografía

- Brynes J.J, Downey K.M, Esserman L, So AG. (1975). "Mechanism of hemin inhibition of erythroid cytoplasmic DNA polymerase". *Biochemistry*, Vol. 14, No. 4, pp.: 796-799.
- Bugert P., Scharberg E.A., Geisen C., Von Zabern I., Flegel W. (2009). RhCE protein variants in Southwestern Germany detected by serologic routine testing. *Transfusion*, 49:1793-1802.
- Carritt, B., Kemp, T. J., & Poulter, M. (1997). Evolution of the Human RH (Rhesus) Blood Group Genes: A 50-Year-Old Prediction (Partially) Fulfilled. *Human Molecular Genetics*, 6(6), 843-850.
- Casas J., Friedman D.F., Tanno Jackson T., Vege S., Westhoff CM., Chou S.T. (2015). Changing practice: red blood cell typing by molecular methods for patients with sickle cell disease. *Transfusion* 55:1388–1393.
- Cavalli-Sforza, L.L., Menozzi, P. & Piazza. (1994). *A. The History and Geography of Human Genes* (Princeton Univ. Press, Princeton, New Jersey).
- Chen, J.-C., Lin, T.-M., Chen, Y. L., Wang, Y.-H., Jin, Y.-T., & Yue, C.-T. (2004). RHD 1227A Is an Important Genetic Marker for RhD el Individuals. *American Journal of Clinical Pathology*, 122(2), 193-198.
- Chilcott, J., Jones, M. L., Wight, J., Forman, K., Wray, J., Beverley, C., & Tappenden, P. (2003). A review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of routine anti-D prophylaxis for pregnant women who are rhesus-negative. *Health Technology Assessment*. 7 (4).
- Christiansen, M., Samuelsen, B., Christiansen, L., Morbjerg, T., Bredahl, C., & Grunnet, N. (2008). Correlation between serology and genetics of weak D types in Denmark. *Transfusion*. 48, 187-193.
- Christiansen M., Sørensen B.S., Grunnet N. (2010). RHD positive among C/E+ and D- blood donors in Denmark. *Transfusion*. 50, 1460-1464.
- Colin Y, Chérif-Zahar B, Le Van Kim C, Raynal V, Van Huffel V, Cartron J. (1991). Genetic basis of the RhD positive and RhD negative blood group polymorphism as determined by southern analysis. *Blood*, 78: 2747-2752.
- Coombs RRA, Mourant AE, Race RR. (1945). A new test for the detection of weak and incomplete Rh ag- glutinins. *Br J Exp Pathol*. 26: 225.
- Credidio D.C., Pellegrino J., Castilho L. (2011). Serologic and molecular characterization of D variants in Brazilians: impact for typing and transfusion strategy. *Immunohematology*. 27: 6-11.
- Curtis, B. R., & McFarland, J. G. (2014). Human platelet antigens—2013. *Vox Sanguinis*, 106(2), 93-102.
- Daniels G, Anstee D, Cartron J, Dahr W, Jørgensen J, Kornstad L, Levene C, Lomas-Francis C, Lubenko A, Mallory D, Moulds J, Okubo Y, Overbeeke M, Reid M, Rouger P, Seidl S, Sistonen P, Wendel S, Woodfield G, Zelinski T. (1995). Blood Group Terminology 1995: ISBT Working Party on Terminology for Red Cell Surface Antigens. *Vox Sang*, 69: 265–279.
- Daniels, G. (2011). Blood grouping by molecular genetics: Blood grouping by molecular genetics. *ISBT Science Series*, 6(2), 257-260.
- Daniels G. (2013a). *Human Blood Groups*. 3rd edition ed: Blackwell Science; 182- 258.

## Bibliografía

- Daniels G. (2013b). Variants of RhD-current testing and clinical consequences. *British Journal of Haematology*. 161: 461-470.
- Das S; Brown T.M; Kellar K.L; Holloway B.P; Morrison C.J. (2006). DNA probes for the rapid identification of medically important *Candida* species using a multianalyte profiling system. *Federation of European Microbiological Societies*. 46: 44–250.
- Davoren, A., Curtis, B. R., Aster, R. H., & McFarland, J. G. (2004). Human platelet antigen-specific alloantibodies implicated in 1162 cases of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*, 44(8), 1220-1225.
- Dean L. (2005). "The Rh blood group". *Blood Groups and Red Cell Antigens*. National Center for Biotechnology Information. Bethesda, Md. NCI, 7. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2261/>. Consultado: Agosto, 2019.
- Denomme GA, Fernandes BJ. (2007). Fetal blood group genotyping. *Transfusion*, 47:64S–68S.
- Denomme GA. (2011). Molecular basis of blood group expression. *Transfusion and Apheresis Science* 44:53-63.
- Diaz M.R; W. Fell W.J. (2004). High-Throughput Detection of Pathogenic Yeasts of the Genus *Trichosporon*. *Journal of clinical microbiology*. 42: 3696–3706.
- Dunbar, S. A., Vander Zee, C. A., Oliver, K. G., Karem, K. L., and Jacobson, J. W. (2003). Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAP (TM) system. *J. Microbiol. Methods* 53, 245–252.
- Dunbar, S. A. (2006). Applications of Luminex (R) xMAP™ technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. *Clinica Chimica Acta*. 363: 71–82.
- Dunbar S.A., Li D. (2010). Introduction to Luminex xMAP Technology and Applications for Biological Analysis in China. 14(10), 26-30.
- Ellison S.L. R; Williams A. (Eds). *Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. 3rd. 2012. Recuperado de: [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org).
- Fernández M. L., Lombardía, J., Sánchez J. M., Sánchez-Dehesa A. (2000). Isoinmunización Rh. Revisión de conjunto. *SEMERGEN - Medicina de Familia*, 26(11), 530-534
- Fisher R, Race R. (1946). Rh gene frequencies in Britain. *Nature*, 157: 48-52.
- Fitzgerald C; Collins M; Van Duyne S; Mikoleit M; Teresa Brown T; Fields P. (2007). Multiplex, Bead-Based Suspension Array for Molecular Determination of Common *Salmonella* Serogroups. *Journal of clinical microbiology*. 45: 3323–3334.
- Flegel W. Wagner F. (2002). Molecular biology of Partial D and weak D. Implications for blood bank practice. *Clin Lab*, 48: 53-59.
- Flegel W. (2006). How I manage donors and patients with a weak D phenotype? *Current Opinion in Hematology*, 13: 476–483.
- Flegel W. (2007a). The Genetics of the Rhesus Blood Group System. *Blood Transfusion* 5(2): 50–57.

## Bibliografía

- Flegel, W. (2007b). Blood group genotyping in Germany. *Transfusion*, 47: 47s-53s.
- Flegel W. (2011). Molecular genetics and clinical applications for RH. *Transfusion and Apheresis Science*, 44, 81–91.
- Flegel, W. Zabern, I. V., & Wagner, F. F. (2009). Six years' experience performing RHD genotyping to confirm D- red blood cell units in Germany for preventing anti-D immunizations. *Transfusion*, 49(3), 465-471.
- Flegel W. Roseff SD., Tholpady A. (2014). A Phasing-in RHD genotyping. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 138(5): 585-588.
- Fennell K., Hoffman R., Yoshida K., Iwamoto S. Govender L. Vather K. Sookraj A. Jentsch U., Pambrun C., McAuley C., Keller M.A., Ochoa-Garay G. (2017). Effect on gene expression of three allelic variants in GATA motifs of *ABO*, *RHD*, and *RHCE* regulatory elements. *Transfusion* 57;2804–2808.
- Franchis R, Cross NCP, Foulkes NS, Cox TM. (1988). "A potent inhibitor of Taq DNA polymerase copurifies with human genomic DNA". *Nucleic Acids Res.*, Vol. 16, p.: 10355.
- Garcia-Sanchez F, Rodriguez MA, Barbolla L, et al. (2011). Analysis of the RhD phenotype-genotype discrepancies encountered during extensive genotyping with BLOODchip. Results of a two year's experience of the Spanish BLOODchip users' group (2009-2010). *Vox Sang.*; 101 (Suppl 1): 4D-S21–05.
- Gardener G.J., Legler T.J., Hyett J.A., Liew Y-W., Flower R.L., Hyland C.A. (2012). Anti-D in pregnant women with the RHD (IVS3+1G>A) - associated DEL phenotype. *Transfusion*. 52:2016-2019.
- Giavedoni L.D. (2005). Simultaneous detection of multiple cytokines and chemokines from nonhuman primates using luminex technology. *Journal of Immunological Methods* 301: 89 – 101.
- Giollo M., Minervini G., Scalzotto M., Leonardi E., Ferrari C., Tosatto S. (2015). BOOGIE: Predicting Blood Groups from High Throughput Sequencing Data. *PLOS ONE*. 10: e0124579
- Gómez C., González R., Viruela R. (2009). Conductividad de las disoluciones electrolíticas. Laboratorio Química Física. Universidad de Valencia.
- Gowland, P., Gassner, C., Hustinx, H., Stolz, M., Gottschalk, J., Tissot, J.-D., Niederhauser, C. (2014). Molecular RHD screening of RhD negative donors can replace standard serological testing for RhD negative donors. *Transfusion and Apheresis Science*, 50(2), 163-168.
- Granier, T., Chiaroni, J., Bailly, P., & Silvy, M. (2017). First description of a D-CE-D hybrid gene on a weak D Type 2 molecular background. *Transfusion*, 57(5), 1248-1253
- Grifols Therapeutics LLC. (2018). HyperRHO S/D Mini-Dose (Rho [D] immune globulin [human]) prescribing information. Research Triangle Park.NC.
- Guzijan G; Srzentic S.J; Jankovic N.P; Djilas I; Lilić M. (2019). Implementation of Molecular RHD Typing at Two Blood Transfusion Institutes from Southeastern Europe. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 46:114-120.

## Bibliografía

Haer-Wigman L., Veldhuisen B., Jonkers R., Lodén M., Madgett T., Avent N., Haas M., Schoot C.E. (2013). RHD and RHCE variant and zygosity genotyping via multiplex ligation-dependent probe amplification. *Transfusion*. 53:1559-1574.

Heddle NM, Klama L, Frassetto R, P. O'Hoski P., B. Leaman B. (1993). A retrospective study to determine the risk of red cell alloimmunization and transfusion during pregnancy. *Transfusion* 33:217-220.

Hendrickson JE, Tormey CA. (2016). Understanding red blood cell alloimmunization triggers. *Hematology American Society of Hematology*. 2016:446-451.

Houser, B. (2012). Bio-Rad's Bio-Plex® suspension array system, xMAP technology overview. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 118(4), 192-196.

<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>. Consultado: Mayo 2019.

Huang C, Liu P, Cheng J. (2000). Molecular biology and genetics of the Rh blood group system. *Semin Hematol* 37:450-165.

ID RHD XT (Instrucciones de uso). (2019). Progenika Biopharma, a Grifols Company. 1-23.

Illumina. (2016) Using a PhiX Control for HiSeq® Sequencing Runs A low-concentration spike-in of Illumina PhiX Control v3 provides quality and calibration controls.

Illustra™ Ready-To-Go™ GenomiPhi™ V3 DNA Amplification Kit. GE Healthcare. (2012).1º edición.

International Society of Blood Transfusion (ISBT). Nombres para los alelos del grupo sanguíneo RH (ISBT 004). (2019). Disponible en <http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/>. Consultado: Agosto, 2019c.

International Society of Blood Transfusion. Table of blood group antigens v.8.1\_181111. System 004(RH).[http://www.isbtweb.org/fileadmin/user\\_upload/Working\\_parties/WP\\_on\\_Red\\_Cell\\_Immuno\\_genetics\\_and/Table\\_of\\_blood\\_group\\_antigens\\_within\\_systems\\_v8.1\\_181111.pdf](http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/Working_parties/WP_on_Red_Cell_Immuno_genetics_and/Table_of_blood_group_antigens_within_systems_v8.1_181111.pdf). Consultado: Agosto, 2019b.

International Society of Blood Transfusion. Table of blood group systems v5.1\_180207. Recuperado de [http://www.isbtweb.org/fileadmin/user\\_upload/Red\\_Cell\\_Terminology\\_and\\_Immunogenetics/Table\\_of\\_blood\\_group\\_systems\\_v6\\_180621.pdf](http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/Red_Cell_Terminology_and_Immunogenetics/Table_of_blood_group_systems_v6_180621.pdf). Consultado: Agosto, 2019a.

Juan M., González-Navarro E.A. (2014). Aplicaciones clínicas de la citometría de flujo . Ed Cont Lab Clín; 17: 62-70

Jungbauer C, Hobel CM, Schwartz DW, et al. (2012). High-throughput multiplex PCR genotyping for 35 red blood cell antigens in blood donors. *Vox Sanguinis* 102:234-42.

Kandavelou K; Chandrasegaran S (2008). "Plasmids for Gene Therapy". *Plasmids: Current Research and Future Trends*. Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-35-

Karanth L, Jaafar SH, Kanagasabai S, Nair NS, Barua A. (2013). Anti-D administration after spontaneous miscarriage for preventing Rhesus alloimmunisation. *Cochrane Database Syst Rev*. 3: 1-19.

## Bibliografía

- Kennedy MS. (2011). Perinatal issues in transfusion practices. In: Roback JD, Grossman BJ, Harris T, Hillyer CD, editors. Technical Manual. 17th ed. Maryland, United States: AABB. 631-645.
- Keramati MR, Shakibaei H, Kheiyami MI, Ayatollahi H, Badii Z, Samayati M, et al. (2011). Blood group antigens frequencies in the northeast of Iran. *Transfusion and Apheresis Science* 45(2):133-136.
- Khosroshahi, B. N., Oodi, A., Namjou, S., Gholamali, T., & Amirizadeh, N. (2019). RHD Genotyping by Molecular Analysis of Hybrid Rhesus box in RhD-Negative Blood Donors from Iran. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*, 35(1), 119-124.
- Koelewijn, J. M., Vrijkotte, T. G. M., Schoot, C. E. V. D., Bonsel, G. J., & Haas, M. D. (2008). Effect of screening for red cell antibodies, other than anti-D, to detect hemolytic disease of the fetus and newborn: A population study in the Netherlands. *Transfusion*, 48(5), 941-952.
- Körmöczy GF, Legler TJ, Daniels GL, et al. (2004). Molecular and serologic characterization of DWI, a novel "high-grade" partial D. *Transfusion* 44:575-80.
- Körmöczy GF., Gassner C., Shao C.P., Uchikawa M., Legler TJ. (2005). A comprehensive analysis of DEL types: partial DEL individuals are prone to anti-D alloimmunization. *Transfusion* 45:1561–1567.
- Landsteiner K, Wiener AS. (1941). Studies on an agglutinin (Rh) in human blood reacting with anti-Rhesus sera and with human isoantibodies. *J Exp Med* 74(4):309-20.
- Le Van Kim, C. L., Colin, Y., & Cartron, J.-P. (2005). Rh proteins: Key structural and functional components of the red cell membrane. *Blood Reviews*, 20(2), 93-110.
- Levine P, Celano M, Wallace J, Sanger R. (1963). A human D-like antibody. *Nature*, 198: 596-597.
- Levine P, Stetson R. (1939). An unusual case of intra-group agglutination. *J Am Med Ass*, 113:126-127.
- Leys C; Ley C; Klein O; Bernard P; Licata L. (2003). Detecting outliers: Do not use standard deviation around the mean, use absolute deviation around the median. *Journal of Experimental Social Psychology*. 49: 764-766.
- Li Q., Hou L., Guo Z-H., Ye L-Y., YUe D-Q., Zhu Z-Y. (2009). Molecular basis of the RHD gene in blood donors with DEL phenotypes in Shanghai. *Vox Sanguinis* 97, 139–146.
- Li, R. S., Ling, B., & Lu, P. (2018). Development of quantitative monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens assay for antibodies against human platelet antigen-1a, 3a, and 5b. *Platelets*, 29(1), 71-75.
- Liu Z., Liu M., Mercado T., Illoh O., Davey R. (2014). Extended blood group molecular typing and next-generation sequencing. *Transfusion Medicine Reviews* 28: 177-186.
- López de Heredia U. (2016). Las técnicas de secuenciación masiva en el estudio de la diversidad biológica. *Munibe, Ciencias Naturales* 64.

## Bibliografía

- López de Roux, MR., Cortina L. (2000). Enfermedad hemolítica perinatal. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 16(3), 161-183.
- Malcorra J.J. Hemoglobinopatías y Talasemias. (2001). *BSCP Can Ped*, 25 (2): 265-77.
- Malomgré, W., Neumeister, B. (2009). Recent and future trends in blood group typing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(5), 1443-1451
- Mardis E.R. (2008). Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 9: 387- 402.
- McGeoch C, Mitchell C, Carritt B, Avent N, Ridgwell K, Tanner M, Spurr N. (1992). Assignment of the chromosomal locus of the human 30 kDa Rh (rhesus) blood group-antigen-related protein (Rh30A) to chromosome region 1p36.13-p34. *Cytogenet Cell Genet*, 59: 261-262.
- McGowan EC, Lopez GH, Knauth CM, et al. (2017). Diverse and novel RHD variants in Australian blood donors with a weak D phenotype: implication for transfusion management. *Vox Sang.*, 112:279–287.
- Mota, M., Fonseca, N. L., Rodrigues, A., Kutner, J. M., & Castilho, L. (2005). Anti-D alloimmunization by Weak D type 1 red blood cells with a very low antigen density. *Vox Sanguinis*, 88(2), 130-135.
- Müller, S. P., Bartels, I., Stein, W., Emons, G., Gutensohn, K., Köhler, M., & Legler, T. J. (2008). The determination of the fetal D status from maternal plasma for decision making on Rh prophylaxis is feasible. *Transfusion*, 48(11), 2292-2301.
- Muñiz Díaz E., Arilla M, Ibanez M, et al. (1993). Frequency of platelet alloantigens in the Spanish population. *Sangre (Barc)* 1993; 38:289–293.
- Munshi A. (2012). DNA Sequencing – Methods and Applications. Rijeka. InTech.
- Muñiz Díaz E., Nogués N., Montero R., Canals C., (2012a). Los grupos sanguíneos eritrocitarios. En A.Cortés Buelvas, M. Muñoz Gómez, S. Jaramillo Velásquez (coords.). *Aplicaciones y práctica de la Medicina Transfusional (Tomo I)* (pp.255-317). Santiago de Cali, Colombia.
- Muñiz Díaz E., Canals C., Nogués N. (2012b). Los grupos sanguíneos plaquetarios y su importancia clínica. En A.Cortés Buelvas, M. Muñoz Gómez, S. Jaramillo Velásquez (coords.). *Aplicaciones y práctica de la Medicina Transfusional (Tomo I)* (pp.255-317). Santiago de Cali, Colombia.
- Nance ST, Lomas-Francis C. (2013). Where are we in efforts to unravel the complexity of Rh to guide transfusion decisions?. *Transfusion*, 53:2840–2843.
- Nuchnoi, P., Thongbus, J., Srisarin, A., Kerdpin, U., & Prachayasittikul, V. (2014). Clinical and Laboratory Update on the DEL Variant. *Laboratory Medicine*, 45(4), 285-290.
- Nuttie, X., Huddleston, J., O’Roak, B. J., Antonacci, F., Fichera, M., Romano, C., Eichler, E. E. (2013). Rapid and accurate large-scale genotyping of duplicated genes and discovery of interlocus gene conversions. *Nature Methods*, 10, 903.

## Bibliografía

Okuda H, Suganuma H, Tsudo N, Omi T, Iwamoto S, Kajii E. (1999). Sequence Analysis of the Spacer Region between the RHD and RHCE genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 263: 378–383.

Okuda H, Suganuma H, Kamesaki T, et al. (2000). The analysis of nucleotide substitutions, gaps and recombination events between RHD and RHCE genes through complete sequencing. *Biochem Biophys Res Commun* 274:670-683.

One of the highest resolutions for particle sizing and counting. (2009). Multisizer 3 coulter counter. Beckman Coulter. Recuperado de: <https://www.beckman.es/cell-counters-and-analyzers/z-series-coulter-counter/features>

Orzińska, A., Guz, K., Polin, H., Pelc-Kłopotowska, M., Bednarz, J., Gieleżyńska, Sliwa B., Kowalewska M., Pawłowska E., Włodarczyk B., Malaga M., Zmudzin A., Krzemienowska M., Srivastava K., Michalewska B., Gabriel C., Flegel W.A., Brojer E. (2013). RHD variants in Polish blood donors routinely typed as D-. *Transfusion*. 53, 2945-2953.

Ouwehand, W. H., Stafford, P., Gheveart, C., Campbell, K., Allen, D., Smith, G., Watkins, N. (2006). Platelet immunology, present and future. *ISBT Science Series*, 1(1), 96-102.

Paisan Y. P.; Moret J. P. (2010). La repetibilidad y reproducibilidad en el aseguramiento de la calidad de los procesos de medición. *Tecnología química*. 2- 117-121.

Pajares-Zamudio A. (2017). El laboratorio de inmunohematología: de la serología a la biología molecular. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 36 (2).

Peralta Martínez Z., Estrada Díaz C., González Hernández Y. (2015). Importancia de anticuerpos irregulares en medicina Transfusional. Departamento de Bioanálisis Clínico. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. 1-63.

Petty, A. C., Green, C. A., & Daniels, G. L. (1997). The monoclonal antibody-specific immobilization of erythrocyte antigens assay (MAIEA) in the investigation of human red-cell antigens and their associated membrane proteins. *Transfusion Medicine (Oxford, England)*, 7(3), 179-188

Polin, H., Danzer, M., Gaszner, W., Broda, D., St-Louis, M., Pröll, J., Gabriel, C. (2009). Identification of RHD alleles with the potential of anti-D immunization among seemingly D- blood donors in Upper Austria. *Transfusion*, 49(4), 676-681.

QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook (2016).5º edition.

Quintero Santacruz M. (2014). Refratariedad plaquetaria a la transfusión: actualización y realidad en latinoamérica. 2 (12), 44-49.

Ramírez, L. M. B., Serrano, M. E. D., Ramos, J. P., Zamora, A. C., Arroyo, F. G. (2004). Citometría de flujo: Vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. 17(1), 15.

Raud L, Le Marechal C, Ferec C, et al. (2017). Weak D type 1, 2 and 3 subtype alleles are rare in the Western French population. *Transfus Med* <https://doi.org/10.1111/tme.12485>

## Bibliografía

- Reid, M. E., Rios, M., Powell, V. I., Charles-Pierre, D., & Malavade, V. (2000). DNA from blood samples can be used to genotype patients who have recently received a transfusion. *Transfusion*, 40(1), 48-53
- Reid, M. E. (2003). Applications of DNA-based assays in blood group antigen and antibody identification. *Transfusion*, 43(12), 1748-1757.
- Reid ME, Lomas-Francis C. (2004). *The Blood Group Antigen Facts Book*. Second ed. New York: Elsevier Academic Press.
- Reslova N; Michna V; Kasny M; Mikel P; Kralik P. (2017). xMAP Technology: Applications in Detection of Pathogens. *Front Microbiol*. 8: 55.
- Rodríguez A, Hernández D, Gracia J. (2004). Enfermedad hemolítica del recién nacido. *Haematologica* 89:30-7.
- Rodríguez-Moyado H, Quintanar-García E, Mejía- Arregui MH. (2004). El banco de sangre y la medicina transfusional. Primera edición. México: Editorial Panamericana; 159-160.
- Rodríguez, I. P., Barrera. H. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Revista Ciencia uanl*. 2 (3), 323-335.
- Rosenfield R, Allen F, Swisher S, Kochwa S. (1962). A review of Rh serology and presentation of new terminology. *Transfusion*, 2: 287-312.
- Rouillac C, Colin Y, Hughes-Jones N, Beolet M, D'Ambrosio A, Cartron J, Le Van Kim C. (1995). Transcript analysis of D category phenotypes predicts hybrid Rh D-CE-D proteins associated with alteration of D epitopes. *Blood*, 85: 2937-2944.
- Rouillac, C., Gane, P., Cartron, J., Le Penneç, P., Cartron, J., & Colin, Y. (1996). Molecular basis of the altered antigenic expression of RhD in weak D (Du) and RhC/e in RN phenotypes. *Blood*, 87, 4853-4861.
- S Das - Blood Groups, 2019 - intechopen.com
- Sandler, S. G., Langeberg, A., Avery, N., Mintz, P. D. (2000). A fully automated blood typing system for hospital transfusion services. *Transfusion*, 40(2), 201-207.
- Sandler S., Flegel W., Westhoff C., Denomme G., Delaney M., Keller M., Johnson S., Katz L., Queenan J., Vassallo R., Simon C. (2015). It's time to phase in RHD genotyping for patients with a serologic weak D phenotype. *Transfusion*. 55: 680-689.
- Sandler S.G., Chen L.N., Flegel W.A. (2017). Serological weak D phenotypes: a review and guidance for interpreting the RhD blood type using the RHD genotype. *British Journal of Haematology*. 179, 10–19.
- Sanz J, Besses C, Vives J. (2006). *Hematología clínica*. 5ª ed. Madrid: Elsevier.
- Sapatnekar S., Figueroa P.I. (2014). How do we use molecular red blood cell antigen typing to supplement pretransfusion testing? *Transfusion* 54:1452-1458.
- Schenkel-Brunner, H. (2000). *Human Blood Groups: Chemical and Biochemical Basis of Antigen Specificity*. 2ed. Springer Science & Business Media. Viena, Austria

## Bibliografía

- Scott ML. (2004). The complexities of the Rh system. *Vox Sanguinis* 87 (1): 58-62.
- SequalPrep™ Normalization Plate (96) Kit. (2008). Invitrogen Corporation.
- Simsek, S., Jong, C. A. M., Cuijpers, H. Th. M., Bleeker, P. M. M., Westers, T. M., Overbeeke, M. A. M., Goldschmeding R., Van der Schoot C.E. (1994). Sequence Analysis of cDNA Derived from Reticulocyte mRNAs Coding for Rh Polypeptides and Demonstration of E/e and C/c Polymorphisms. *Vox Sang.* 67:203-209.
- Singleton B., Green C., Avent N., Martin P., Smart E., Daka A., Narter-Olaga E., Hawthorne L., Daniels G. (2000). The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the Rh D-negative blood group phenotype. 95:12-18.
- Blood Type Frequencies by Country including the Rh Factor. Recuperado de: <http://www.rhesusnegative.net/themission/bloodtypefrequencies/>. Consultado: Agosto, 2019
- Sociedad Española de Transfusión Sanguínea y Terapia Celular (2008). Protocolo de diagnóstico y prevención de la enfermedad Hemolítica del feto y del recién nacido. 1-15.
- Szulman A., Marcondes L, Nardoza M., Barreto J., Araujo E., Fernandes A. (2012). Investigation of pseudogenes RHDΨ and RHD -CE-D hybrid gene in D-negative blood donors by the real time PCR method. *Transfusion and Apheresis Science.* 47: 289–293.
- Taq PCR Handbook (2010). QIAGEN. 3º edition.
- Thomas C.M., Summers D. (2008). Bacterial plasmids. *Encyclopedia of Life Sciences.* John Wiley and Sons Limited, Chicester, doi: 10.1002/9780470015902.a0000468.pub2.
- Tilley L., Grimsley S. Is Next Generation Sequencing the future of Blood Group testing? (2014). *Transfusion and Apheresis Science* 50: 183-188.
- Tippett P. (1986). A speculative model for the Rh blood groups. *Ann Hum Genet,* 50: 241-247.
- Torres AP, D Camberato, RG López, M Mickelbart. (2010). Medición de pH y conductividad eléctrica en sustratos. *Purdue Extension HO-237-SW.* West Lafayette, USA. Purdue University. 1-6.
- Trucco Boggione C. (2016). Estudio de las bases moleculares responsables de los fenotipos D negativo y D variante del sistema Rh en la población argentina. Importancia clínica (Tesis doctoral). Facultad de ciencias bioquímicas y farmacéuticas Universidad Nacional de Rosario, Argentina.
- Urbaniak, S. J. (2002). Alloimmunity to Human Red Blood Cell Antigens. *Vox Sanguinis,* 83, 293-297.
- Urdaneta S., Urdaneta J.R., Villalobos de Vega S., Zambrano, N. B., Ruíz, A. G., Valbuena G., Contreras A., Fernández M.E. (2018). Prevalencia de isoimmunización Rhesus en embarazadas. *Rev Obstet Ginecol Venez,* 78(2): 122 - 131.
- Vázquez, J. A., Vassallo, E., & Storino, M. A. (2002). Reacciones Postransfusionales. *Revista de la Facultad de Medicina,* 25(2), 154-162.
- Vega Robledo G. B. (2009). Antígenos e inmunógenos. *Rev Fac Med UNAM,* 52 (1), 41-42.

## Bibliografía

- Villa M., Pérez R. (2011). Aloinmunización en pacientes dependientes de transfusión de glóbulos rojos: revisión sistemática. *Hechos Microbiol.* 2: 63-69.
- Wagner F., Gassner C., Müller T.H., Schönitzer D., Schunter F., Flegel W. (1999). Molecular Basis of Weak D Phenotypes. *Blood*, 93: 385-393.
- Wagner F., Flegel W. (2000). RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood* 95:3662-3668.
- Wagner F., Frohmajer A., Flegel (2001). W. RHD positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genetics* 2:10.
- Wagner F, Flegel W. (2002). RHCE represents the ancestral RH position, while RHD is the duplicated gene. *Blood*, 99: 2272-2273.
- Wagner F, Flegel W. (2004). Review: the molecular basis of the Rh blood group phenotypes. *Immunohematology*, 20: 23-36.
- Wagner T, Körmöczi GF, Buchta C, Vadon M, Lanzer G, Mayr WR, Legler TJ (2005). Anti-D immunization by DEL red blood cells. *Transfusion* 45:520 – 526.
- Wagner F.F, Flegel WA. The Rhesus Base. Recuperado de: <http://rhesusbase.info/>. Consultado: Agosto, 2019.
- Weisbach, V., Kohnhauser, T., Zimmermann, R., Ringwald, J., Strasser, E., Zingsem, J., & Eckstein, R. (2006). Comparison of the performance of microtube column systems and solid-phase systems and the tube low-ionic-strength solution additive indirect antiglobulin test in the detection of red cell alloantibodies. *Transfusion Medicine*, 16(4), 276-284
- Westhoff, C. (2006). Molecular testing for transfusion medicine: Current Opinion in Hematology, 13(6), 471-475.
- Westhoff, C. (2007). The structure and function of the Rh antigen complex. *Seminars in Hematology*, 44, 42-50.
- Westhoff C. (2010). The Rh blood group system. In L. Williams- Wilkins (Ed.). *Immunohematology Principles and Practice*. pp.139-149. Michigan. Wolters Kluwer.
- Westhoff C. (2016). Siegel D.L. *Rossi's Principles of Transfusion Medicine*. Rh and LW blood group antigens. John Wiley & Sons, Ltd. 14: 176-184.
- Wiener A. (1951). Rh-Hr blood types: serology, genetics and nomenclature. *Trans NY Acad Sci*, 13: 198-204.
- Wilson W.J; Erler A.M; Nasarabadi S.L; Skowronski E.W; Imbro P.M. (2005). A multiplexed PCR-coupled liquid bead array for the simultaneous detection of four biothreat agents. *Molecular and Cellular Probes* 19: 137–144.
- Winkelhorst, D., Porcelijn, L., Muizelaar, E., Oldert, G., Huiskes, E., & Schoot, C. E. (2019). Fast and low-cost direct ELISA for high-throughput serological HPA-1a typing. *Transfusion*, 99(9);1–8

## Apéndices

APÉNDICE 1. RESUMEN DEL NÚMERO TOTAL DE OBSERVACIONES PARA CADA FENOTIPO PREDICHO EN TODAS LAS MUESTRAS Y RÉPLICAS DEL ESTUDIO DE ESTABILIDAD REAL.

Antigen	Time-point	Reagent lot	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
D (RH1)	T3	L2	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T3	L2	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T3	L2	Weak D Types 1, 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T3	L2	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T3	L2	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T3	L2	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T3	L2	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T6	L2	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Time-point	Reagent lot	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
D (RH1)	T6	L2	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T6	L2	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T6	L2	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T6	L2	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T6	L2	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T6	L2	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T9	L2	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T9	L2	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T9	L2	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T9	L2	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Time-point	Reagent lot	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
HPA-1a	T9	L2	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T9	L2	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T9	L2	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T10	L2	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T10	L2	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T10	L2	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T10	L2	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T10	L2	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T10	L2	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T10	L2	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Time-point	Reagent lot	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
D (RH1)	T12	L2	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T12	L2	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T12	L2	Weak D Types 1, 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T12	L2	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T12	L2	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T12	L2	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T12	L2	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T13	L2	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T13	L2	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T13	L2	Weak D Types 1, 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Time-point	Reagent lot	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
HPA-1a	T13	L2	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T13	L2	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T13	L2	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T13	L2	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T15	L2	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T15	L2	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T15	L2	Weak D Types 1, 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T15	L2	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T15	L2	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T15	L2	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Time-point	Reagent lot	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
HPA-1b	T15	L2	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T16	L2	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T16	L2	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T16	L2	Weak D Types 1, 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T16	L2	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T16	L2	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T16	L2	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T16	L2	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T3	L3	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T3	L3	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Time-point	Reagent lot	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
D (RH1)	T3	L3	Weak D Types 1, 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T3	L3	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T3	L3	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T3	L3	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T3	L3	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T6	L3	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T6	L3	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T6	L3	Weak D Types 1, 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T6	L3	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T6	L3	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Time-point	Reagent lot	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
HPA-1b	T6	L3	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T6	L3	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T9	L3	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T9	L3	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T9	L3	Weak D Types 1, 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T9	L3	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T9	L3	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T9	L3	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T9	L3	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T10	L3	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Time-point	Reagent lot	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
D (RH1)	T10	L3	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T10	L3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T10	L3	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T10	L3	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T10	L3	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T10	L3	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T12	L3	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T12	L3	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T12	L3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T12	L3	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Time-point	Reagent lot	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
HPA-1a	T12	L3	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T12	L3	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T12	L3	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T13	L3	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T13	L3	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T13	L3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T13	L3	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T13	L3	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T13	L3	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T13	L3	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Time-point	Reagent lot	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
D (RH1)	T15	L3	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T15	L3	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T15	L3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T15	L3	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T15	L3	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T15	L3	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T15	L3	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T16	L3	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T16	L3	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T16	L3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Time-point	Reagent lot	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
HPA-1a	T16	L3	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T16	L3	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T16	L3	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T16	L3	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T3	L5	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T3	L5	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T3	L5	Weak D Types 1, 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T3	L5	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T3	L5	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T3	L5	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Time-point	Reagent lot	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
HPA-1b	T3	L5	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T6	L5	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T6	L5	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T6	L5	Weak D Types 1, 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T6	L5	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T6	L5	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T6	L5	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T6	L5	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T9	L5	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T9	L5	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Time-point	Reagent lot	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
D (RH1)	T9	L5	Weak D Types 1, 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T9	L5	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T9	L5	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T9	L5	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T9	L5	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T10	L5	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T10	L5	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T10	L5	Weak D Types 1, 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T10	L5	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T10	L5	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Time-point	Reagent lot	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
HPA-1b	T10	L5	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T10	L5	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T12	L5	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T12	L5	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T12	L5	Weak D Types 1, 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T12	L5	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T12	L5	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T12	L5	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T12	L5	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T13	L5	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Time-point	Reagent lot	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
D (RH1)	T13	L5	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T13	L5	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T13	L5	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T13	L5	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T13	L5	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T13	L5	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T15	L5	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T15	L5	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T15	L5	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T15	L5	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Time-point	Reagent lot	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
HPA-1a	T15	L5	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T15	L5	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T15	L5	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T16	L5	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T16	L5	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T16	L5	Weak D Types 1, 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T16	L5	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T16	L5	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T16	L5	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T16	L5	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS

(\*) RHD gene present. D- (RHD\*DIIIa-CE(3-7)-D or RHD\*Pseudogene genotype not detected)

## Apéndices

Apéndice 2. Resumen del número total de observaciones para cada fenotipo predicho en todas las muestras y réplicas del estudio del vial abierto (“Open vial”).

Antigen	Time-point	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
D (RH1)	T6	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T6	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T6	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T6	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T6	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T6	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T6	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T9	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T9	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T9	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Time-point	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
HPA-1a	T9	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T9	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T9	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T9	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T12	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T12	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T12	Weak D Types 1, 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T12	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T12	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T12	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Time-point	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
HPA-1b	T12	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T13	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T13	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T13	Weak D Types 1, 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T13	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T13	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T13	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T13	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T15	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T15	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Time-point	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
D (RH1)	T15	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T15	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T15	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T15	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T15	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T16	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T16	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T16	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T16	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T16	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Time-point	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
HPA-1b	T16	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T16	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS

(\*) *RHD* gene present. *D-* (*RHD*\**DIIIa-CE(3-7)-D* or *RHD*\**Pseudogene* genotype not detected)

## Apéndices

APÉNDICE 3: RESUMEN DE LOS RESULTADOS PARA CADA FENOTIPO PREDICHO EN TODAS LAS MUESTRAS Y RÉPLICAS POR NIVEL DE CONCENTRACIÓN DE ADN Y POR LOTE DE REACTIVO CORRESPONDIENTE AL ESTUDIO DE LÍMITE DETECCIÓN INFERIOR

DNA concentration (ng/μl)	DNA input level (ng)	Reagent Lot	Number Calls Performed	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls %	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
20	100	L2	80	80	100	≥95%	PASS
10	50	L2	80	80	100	≥95%	PASS
5	25	L2	80	80	100	≥95%	PASS
2	10	L2	80	80	100	≥95%	PASS
1	5	L2	80	78	98	≥95%	PASS
0.1	0.5	L2	80	35	44	≥95%	FAIL
0.05	0.25	L2	80	23	29	≥95%	FAIL
20	100	L3	80	80	100	≥95%	PASS
10	50	L3	80	80	100	≥95%	PASS
5	25	L3	80	80	100	≥95%	PASS

## Apéndices

2	10	L3	80	80	100	≥95%	PASS
1	5	L3	80	79	99	≥95%	PASS
0.1	0.5	L3	80	35	44	≥95%	FAIL
0.05	0.25	L3	80	16	20	≥95%	FAIL

APÉNDICE 4. ANÁLISI PROBIT DE LOS "CALL RATE".

**Ajuste de modelo lineal generalizado. Lote Reactivo=Lote 2**

Response: Number Correct Calls

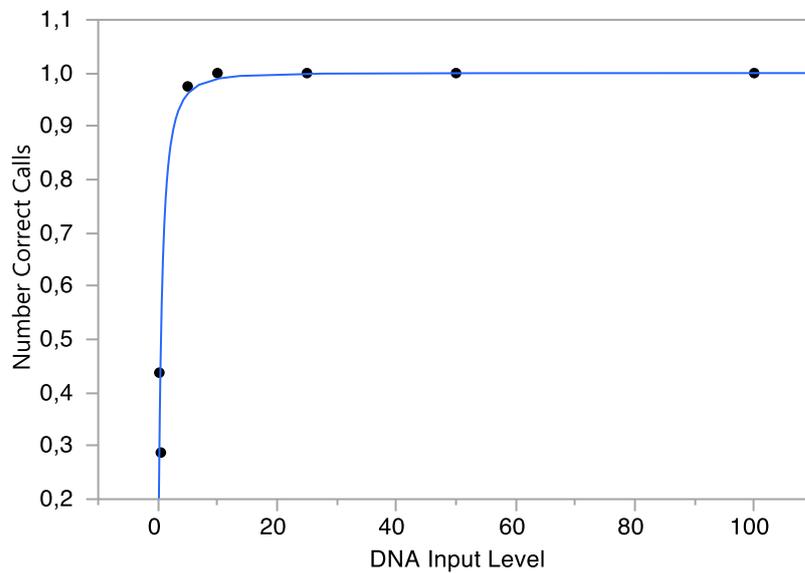
Distribution: Binomial

Link: Probit

Estimation Method: Maximum Likelihood

Observations (or Sum Wgts) = 7

**Gráfico de Regresión**



**Totalidad del test**

Model	-LogLikelihood	L-R ChiSquare	DF	Prob>ChiSq
Difference	144.480037	288.9601	1	<.0001*
Full	18.1492448			
Reduced	162.629282			

Goodness Of Fit Statistic	ChiSquare	DF	Prob>ChiSq
Pearson	23.4905	5	0.0003*
Deviance	24.2433	5	0.0002*

### AICc

43.2985

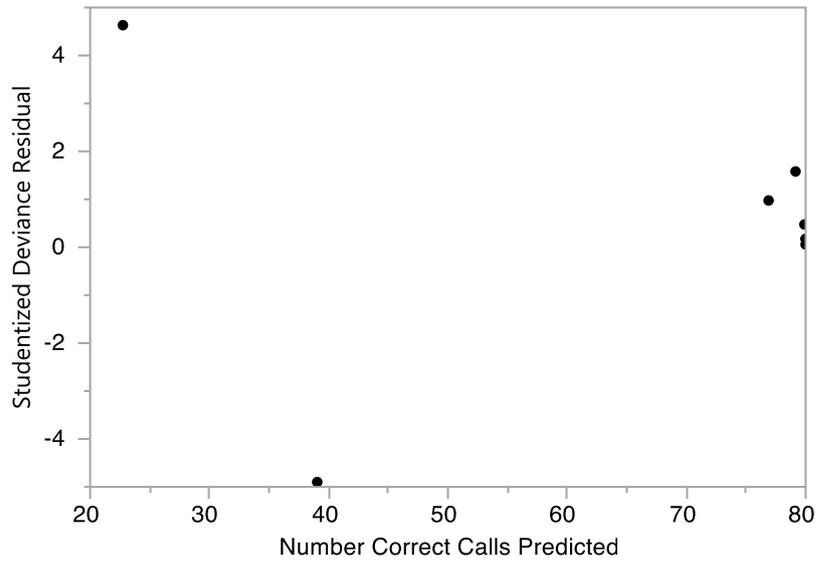
### Efecto en el test

Source	DF	L-R ChiSquare	Prob>ChiSq
Log(DNA Input Level)	1	288.96007	<.0001*

### Parámetros estimados

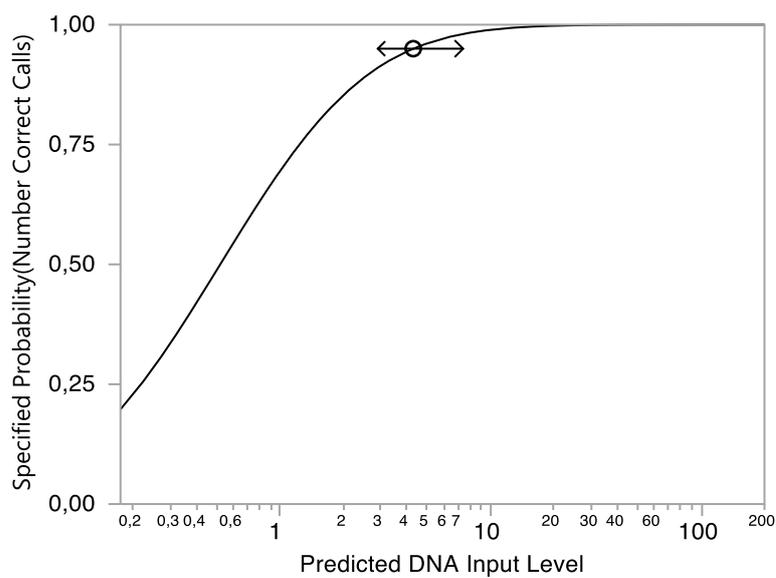
Term	Estimate	Std Error	L-R ChiSquare	Prob>ChiSq	Lower CL	Upper CL
Intercept	0.5100002	0.0999911	30.830105	<.0001*	0.321538	0.7168951
Log(DNA Input Level)	0.7792236	0.0780695	288.96007	<.0001*	0.6396418	0.9485476

## Desviación residual



## Predicción inversa

Specified Probability(Number Correct Calls)	Predicted DNA Input Level	Lower 95%	Upper 95%
0.9500000	4.290443	2.911727	7.408823



## Ajuste de modelo lineal generalizado. Lote Reactivo=Lote 3

Response: Number Correct Calls

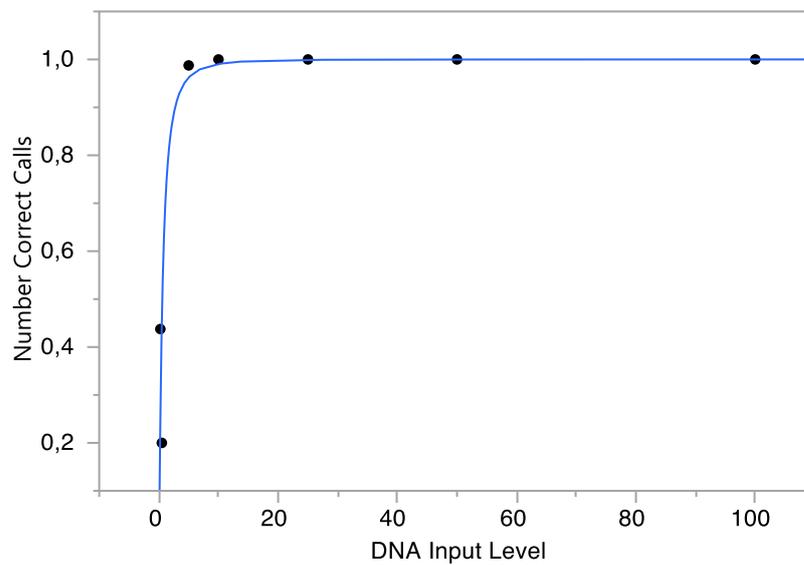
Distribution: Binomial

Link: Probit

Estimation Method: Maximum Likelihood

Observations (or Sum Wgts) = 7

### Gráfico de Regresión



### Totalidad del test

Model	-LogLikelihood	L-R ChiSquare	DF	Prob>ChiSq
Difference	157.156754	314.3135	1	<.0001*
Full	25.6454856			
Reduced	182.80224			

## Apéndices

Goodness Of Fit Statistic	ChiSquare	DF	Prob>ChiSq
Pearson	38.7185	5	<.0001*
Deviance	40.0810	5	<.0001*

### AICc

58.2910

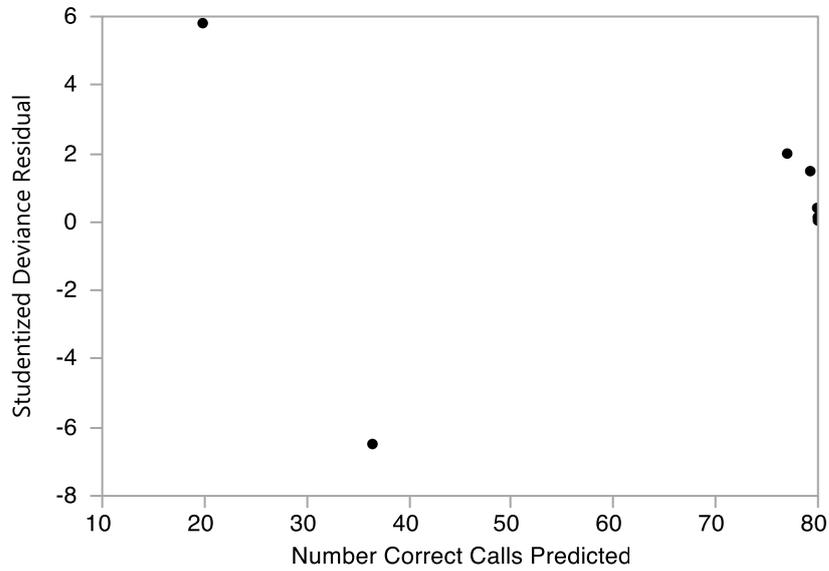
### Efecto en el test

Source	DF	L-R ChiSquare	Prob>ChiSq
Log(DNA Input Level)	1	314.31351	<.0001*

### Parámetros estimados

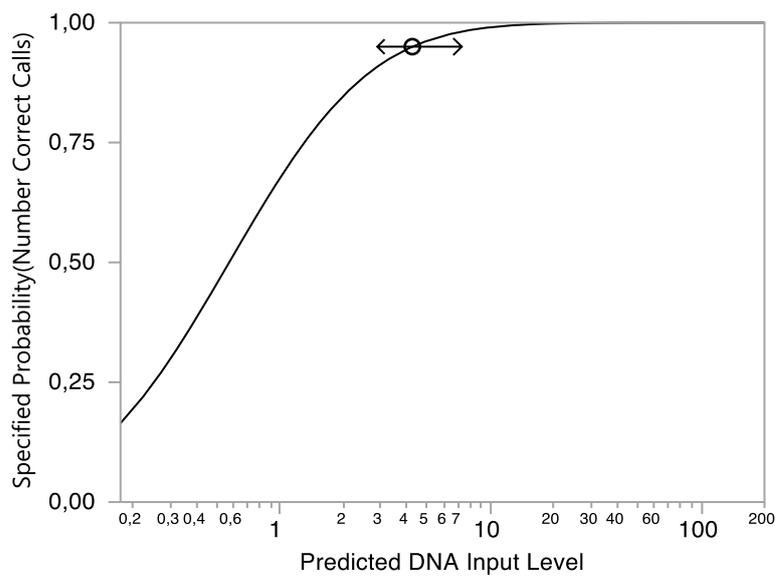
Term	Estimate	Std Error	L-R ChiSquare	Prob>ChiSq	Lower CL	Upper CL
Intercept	0.4569915	0.1029777	23.334324	<.0001*	0.2636974	0.6715873
Log(DNA Input Level)	0.821117	0.0813526	314.31351	<.0001*	0.676245	0.9988249

## Desviación residual



## Precisión inversa

Specified Probability(Number Correct Calls)	Predicted DNA Input Level	Lower 95%	Upper 95%
0.950000	4.248822	2.894895	7.293019



## Apéndices

APÉNDICE 5. RESUMEN DE LOS RESULTADOS PARA CADA FENOTIPO PREDICHO EN TODAS LAS MUESTRAS Y RÉPLICAS POR NIVEL DE CONCENTRACIÓN DE ADN Y POR LOTE DE REACTIVO CORRESPONDIENTE AL ESTUDIO DE LÍMITE DETECCIÓN SUPERIOR

Antigen	DNA concentration (ng/μl)	DNA input level (ng)	Reagent lot	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls %	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls %	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
D (RH1)	200	1000	3201000003	D-	20	20	100	≥95%	PASS	20	100	≥99%	PASS
D (RH1)	200	1000	3201000003	Weak D Type 1	20	20	100	≥95%	PASS	20	100	≥99%	PASS
D (RH1)	200	1000	3201000003	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	40	40	100	≥95%	PASS	40	100	≥99%	PASS
HPA-1a	200	1000	3201000003	+	60	60	100	≥95%	PASS	60	100	≥99%	PASS
HPA-1a	200	1000	3201000003	0	20	20	100	≥95%	PASS	20	100	≥99%	PASS
HPA-1b	200	1000	3201000003	+	40	40	100	≥95%	PASS	40	100	≥99%	PASS
HPA-1b	200	1000	3201000003	0	40	40	100	≥95%	PASS	40	100	≥99%	PASS
D (RH1)	200	1000	3201000004	D-	20	20	100	≥95%	PASS	20	100	≥99%	PASS
D (RH1)	200	1000	3201000004	Weak D Type 1	20	20	100	≥95%	PASS	20	100	≥99%	PASS
D (RH1)	200	1000	3201000004	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	40	40	100	≥95%	PASS	40	100	≥99%	PASS

## Apéndices

HPA-1a	200	1000	3201000004	+	60	60	100	≥95%	PASS	60	100	≥99%	PASS
HPA-1a	200	1000	3201000004	0	20	20	100	≥95%	PASS	20	100	≥99%	PASS
HPA-1b	200	1000	3201000004	+	40	40	100	≥95%	PASS	40	100	≥99%	PASS
HPA-1b	200	1000	3201000004	0	40	40	100	≥95%	PASS	40	100	≥99%	PASS

(\*) *RHD* gene present. D- (*RHD*\**DIIIa-CE(3-7)*-D or *RHD*\**Pseudogene* genotype not detected

## Apéndices

APÉNDICE 6. RESUMEN DE LOS RESULTADOS PARA CADA FENOTIPO PREDICHO EN TODAS LAS MUESTRAS Y RÉPLICAS ANALIZADAS EN EL ESTUDIO DE VERIFICACIÓN DE TERMOCICLADORES

Antigen	Thermocycler	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls %	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls %	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
D (RH1)	ALUMINUM	D-	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
D (RH1)	ALUMINUM	Weak D Type 1	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
D (RH1)	ALUMINUM	Weak D Types 1, 2 or 3 not detected (*)	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS
HPA-1a	ALUMINUM	+	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
HPA-1a	ALUMINUM	0	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
HPA-1b	ALUMINUM	+	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS
HPA-1b	ALUMINUM	0	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS
D (RH1)	GOLD	D-	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
D (RH1)	GOLD	Weak D Type 1	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS

## Apéndices

D (RH1)	GOLD	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS
HPA-1a	GOLD	+	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
HPA-1a	GOLD	0	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
HPA-1b	GOLD	+	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS
HPA-1b	GOLD	0	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS
D (RH1)	VERITI	D-	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
D (RH1)	VERITI	Weak D Type 1	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
D (RH1)	VERITI	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS
HPA-1a	VERITI	+	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
HPA-1a	VERITI	0	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
HPA-1b	VERITI	+	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS
HPA-1b	VERITI	0	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS
D (RH1)	VERITI9700	D-	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS

## Apéndices

D (RH1)	VERITI9700	Weak D Type 1	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
D (RH1)	VERITI9700	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS
HPA-1a	VERITI9700	+	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
HPA-1a	VERITI9700	0	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
HPA-1b	VERITI9700	+	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS
HPA-1b	VERITI9700	0	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS

## Apéndices

APÉNDICE 7. RESUMEN DE LOS RESULTADOS PARA CADA FENOTIPO PREDICHO EN TODAS LAS MUESTRAS, CONDICIONES (CON Y SIN INTERFERENTES) Y RÉPLICAS ANALIZADAS EN EL ESTUDIO DE SUSTANCIAS INTERFERENTES

Antigen	Interferent	Key	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls %	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls %	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
D (RH1)	Bilirubin	B	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS
D (RH1)	Bilirubin	B	D-	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
HPA-1a	Bilirubin	B	+	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
HPA-1b	Bilirubin	B	0	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
D (RH1)	0.1 N NaOH	BS	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS
D (RH1)	0.1 N NaOH	BS	D-	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
HPA-1a	0.1 N NaOH	BS	+	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
HPA-1b	0.1 N NaOH	BS	0	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
D (RH1)	Hemoglobin	H	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Interferent	Key	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls %	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls %	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
D (RH1)	Hemoglobin	H	D-	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
HPA-1a	Hemoglobin	H	+	9	8	89	≥95%	FAIL	8	100	≥99%	PASS
HPA-1b	Hemoglobin	H	0	9	8	89	≥95%	FAIL	8	100	≥99%	PASS
D (RH1)	Triglyceride	T	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS
D (RH1)	Triglyceride	T	D-	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
HPA-1a	Triglyceride	T	+	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
HPA-1b	Triglyceride	T	0	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
D (RH1)	Albumin	A	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS
D (RH1)	Albumin	A	D-	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
HPA-1a	Albumin	A	+	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Interferent	Key	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls %	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls %	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
HPA-1b	Albumin	A	0	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
D (RH1)	Aspirin	AS	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS
D (RH1)	Aspirin	AS	D-	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
HPA-1a	Aspirin	AS	+	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
HPA-1b	Aspirin	AS	0	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
D (RH1)	Ethanol 100%	E	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS
D (RH1)	Ethanol 100%	E	D-	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
HPA-1a	Ethanol 100%	E	+	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
HPA-1b	Ethanol 100%	E	0	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
D (RH1)	Ibuprofen	I	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Interferent	Key	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls %	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls %	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
D (RH1)	Ibuprofen	I	D-	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
HPA-1a	Ibuprofen	I	+	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
HPA-1b	Ibuprofen	I	0	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
D (RH1)	Ethanol 96%	DNA	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS
D (RH1)	Ethanol 96%	DNA	D-	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
HPA-1a	Ethanol 96%	DNA	+	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
HPA-1b	Ethanol 96%	DNA	0	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
D (RH1)	Ampicillin	AM	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS
D (RH1)	Ampicillin	AM	D-	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
HPA-1a	Ampicillin	AM	+	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Interferent	Key	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls %	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls %	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
HPA-1b	Ampicillin	AM	0	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
D (RH1)	Acetaminophen	AC	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS
D (RH1)	Acetaminophen	AC	D-	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
HPA-1a	Acetaminophen	AC	+	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
HPA-1b	Acetaminophen	AC	0	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
D (RH1)	Heparin	HP	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS
D (RH1)	Heparin	HP	D-	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
HPA-1a	Heparin	HP	+	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
HPA-1b	Heparin	HP	0	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
D (RH1)	Warfarin	W	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Interferent	Key	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls %	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls %	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
D (RH1)	Warfarin	W	D-	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
HPA-1a	Warfarin	W	+	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
HPA-1b	Warfarin	W	0	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
D (RH1)	Diphenhydramine	DH	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS
D (RH1)	Diphenhydramine	DH	D-	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
HPA-1a	Diphenhydramine	DH	+	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
HPA-1b	Diphenhydramine	DH	0	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
D (RH1)	Atorvastatin	AT	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS
D (RH1)	Atorvastatin	AT	D-	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
HPA-1a	Atorvastatin	AT	+	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Interferent	Key	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls %	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls %	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
HPA-1b	Atorvastatin	AT	0	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
D (RH1)	DMSO 0.2%	D	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS
D (RH1)	DMSO 0.2%	D	D-	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
HPA-1a	DMSO 0.2%	D	+	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
HPA-1b	DMSO 0.2%	D	0	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
D (RH1)	Unspiked L4	U_L4	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS
D (RH1)	Unspiked L4	U_L4	D-	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
HPA-1a	Unspiked L4	U_L4	+	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
HPA-1b	Unspiked L4	U_L4	0	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
D (RH1)	Unspiked L5	U_L5	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Interferent	Key	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls %	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls %	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
D (RH1)	Unspiked L5	U_L5	D-	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
HPA-1a	Unspiked L5	U_L5	+	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
HPA-1b	Unspiked L5	U_L5	0	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS

APÉNDICE 8. RESUMEN DE LOS RESULTADOS PARA CADA FENOTIPO PREDICHO EN TODAS LAS MUESTRAS ANALIZADAS EN EL ESTUDIO DE PRECISIÓN INTERMEDIA

Antigen	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
D (RH1)	D-	108	108	100	≥95%	PASS	108	100	≥99%	PASS
D (RH1)	Weak D Type 1	108	108	100	≥95%	PASS	108	100	≥99%	PASS
D (RH1)	Weak D Types 1, 2 or 3 not detected (*)	216	216	100	≥95%	PASS	216	100	≥99%	PASS
HPA-1a	+	324	324	100	≥95%	PASS	324	100	≥99%	PASS
HPA-1a	0	108	108	100	≥95%	PASS	108	100	≥99%	PASS
HPA-1b	+	216	216	100	≥95%	PASS	216	100	≥99%	PASS
HPA-1b	0	216	216	100	≥95%	PASS	216	100	≥99%	PASS

(\*) *RHD* gene present. D- (*RHD*\**DIIIa-CE(3-7)-D* or *RHD*\**Pseudogene* genotype not det

APÉNDICE 9. ANÁLISIS DE RESULTADOS DE COMPONENTES DE VARIANZA CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO PRECISIÓN INTERMEDIA

Response RatioA/P Probe Set=13. A/P=A

REML Componentes de la varianza estimados

Random Effect	Var Ratio	Var Component	Pct of Total	CV
Operator	0.1412215	4.6041e-5	4.206	5.9690545
Instrument	1.0408331	0.0003393	30.996	16.204875
Day[Operator.Instrument]	0.6135414	0.0002	18.271	12.441624
Reagent Lot	0.5624131	0.0001834	16.748	11.91195
Residual		0.000326	29.780	15.883826
Total		0.0010948	100.000	29.106908

-2 LogLikelihood = -520.98116

Response RatioA/P Probe Set=13. A/P=P

REML Componentes de la varianza estimados

Random Effect	Var Ratio	Var Component	Pct of Total	CV
Operator	0	0	0.000	0
Instrument	0.1104805	0.0020074	3.773	2.9675518
Day[Operator.Instrument]	1.4527117	0.026395	49.607	10.760817
Reagent Lot	0.3652743	0.0066368	12.473	5.395915

## Apéndices

Random Effect	Var Ratio	Var Component	Pct of Total	CV
Residual		0.0181695	34.148	8.9280279
Total		0.0532087	100.000	15.278322

-2 LogLikelihood = -323.7743732

### Response RatioA/P Probe Set=56. A/P=A

#### REML Componentes de la varianza estimados

Random Effect	Var Ratio	Var Component	Pct of Total	CV
Operator	0.397614	0.0004212	7.414	7.283456
Instrument	1.6591588	0.0017576	30.939	14.878209
Day[Operator.Instrument]	0.9160153	0.0009704	17.081	11.054982
Reagent Lot	1.3899655	0.0014724	25.919	13.617854
Residual		0.0010593	18.647	11.550657
Total		0.0056809	100.000	26.748571

-2 LogLikelihood = -388.7732101

### Response RatioA/P Probe Set=56. A/P=P

#### REML Componentes de la varianza estimados

Random Effect	Var Ratio	Var Component	Pct of Total	CV
Operator	0.0068093	0.0015351	0.509	1.0598957

## Apéndices

Random Effect	Var Ratio	Var Component	Pct of Total	CV
Instrument	0.0351014	0.0079132	2.625	2.4064431
Day[Operator.Instrument]	0.1422659	0.032072	10.638	4.844662
Reagent Lot	0.1531661	0.0345293	11.453	5.0268321
Residual		0.2254369	74.775	12.844378
Total		0.3014864	100.000	14.853692

-2 LogLikelihood = 465.27916609

### Response RatioA/P Probe Set=58. A/P=A

#### REML Componentes de la varianza estimados

Random Effect	Var Ratio	Var Component	Pct of Total	CV
Operator	0.397614	0.0004212	7.414	7.283456
Instrument	1.6591588	0.0017576	30.939	14.878209
Day[Operator.Instrument]	0.9160153	0.0009704	17.081	11.054982
Reagent Lot	1.3899655	0.0014724	25.919	13.617854
Residual		0.0010593	18.647	11.550657
Total		0.0056809	100.000	26.748571

-2 LogLikelihood = -388.7732101

## Response RatioA/P Probe Set=58. A/P=P

### REML Componentes de la varianza estimados

Random Effect	Var Ratio	Var Component	Pct of Total	CV
Operator	0.0068093	0.0015351	0.509	1.0598957
Instrument	0.0351014	0.0079132	2.625	2.4064431
Day[Operator.Instrument]	0.1422659	0.032072	10.638	4.844662
Reagent Lot	0.1531661	0.0345293	11.453	5.0268321
Residual		0.2254369	74.775	12.844378
Total		0.3014864	100.000	14.853692

-2 LogLikelihood = 465.27916609

## Response RatioA/P Probe Set=80. A/P=A

### REML Componentes de la varianza estimados

Random Effect	Var Ratio	Var Component	Pct of Total	CV
Operator	0.0052101	2.1367e-6	0.165	1.1861796
Instrument	0.5748134	0.0002357	18.224	12.45923
Day[Operator.Instrument]	0.6406779	0.0002627	20.313	13.15369
Reagent Lot	0.9333957	0.0003828	29.593	15.876714
Residual		0.0004101	31.705	16.433412
Total		0.0012935	100.000	29.185374

-2 LogLikelihood = -496.3112177

### Response RatioA/P Probe Set=80. A/P=P

#### REML Componentes de la varianza estimados

Random Effect	Var Ratio	Var Component	Pct of Total	CV
Operator	0.1230183	0.0008155	6.830	2.1539861
Instrument	0.1140129	0.0007558	6.330	2.0736482
Day[Operator.Instrument]	0.2626018	0.0017408	14.579	3.1470738
Reagent Lot	0.3016303	0.0019995	16.745	3.3728386
Residual		0.0066291	55.517	6.1412681
Total		0.0119407	100.000	8.2422667

-2 LogLikelihood = -665.4239215

### Response RatioA/P Probe Set=193. A/P=A

#### REML Componentes de la varianza estimados

Random Effect	Var Ratio	Var Component	Pct of Total	CV
Operator	0	0	0.000	0
Instrument	0.1679813	0.0002475	11.775	15.218123
Day[Operator.Instrument]	0.1633887	0.0002408	11.453	15.008651
Reagent Lot	0.0952356	0.0001403	6.676	11.45857
Residual		0.0014736	70.096	37.130488
Total		0.0021023	100.000	44.348877

-2 LogLikelihood = -1158.363594

**Response Ratio A/P Probe Set=193. A/P=P**

**REML Componentes de la varianza estimados**

Random Effect	Var Ratio	Var Component	Pct of Total	CV
Operator	1.7398775	0.0906121	27.873	6.0477293
Instrument	0	0	0.000	0
Day[Operator.Instrument]	2.849936	0.1484235	45.656	7.740171
Reagent Lot	0.6523398	0.0339736	10.451	3.7031383
Residual		0.0520796	16.020	4.5849331
Total		0.3250888	100.000	11.455135

-2 LogLikelihood = 36.168119023

**Response Ratio Probe Set=13. Cluster=3**

**REML Componentes de la varianza estimados**

Random Effect	Var Ratio	Var Component	Pct of Total	CV
Operator	0.155801	6.9141e-6	7.932	0.2718949
Instrument	0.3654813	1.6219e-5	18.607	0.4164362
Day[Operator.Instrument]	0.3206467	1.423e-5	16.325	0.3900581
Reagent Lot	0.1222568	5.4255e-6	6.224	0.2408531

Random Effect	Var Ratio	Var Component	Pct of Total	CV
Residual		4.4378e-5	50.912	0.6888361
Total		8.7167e-5	100.000	0.9653997

-2 LogLikelihood = -2281.479365

**Response Ratio Probe Set=56. Cluster=2**

**REML Componentes de la varianza estimados**

Random Effect	Var Ratio	Var Component	Pct of Total	CV
Operator	0	0	0.000	0
Instrument	0.1317762	6.1834e-6	1.561	0.5136913
Day[Operator.Instrument]	0.0162543	7.6271e-7	0.193	0.1804128
Reagent Lot	7.294502	0.0003423	86.402	3.8219191
Residual		4.6924e-5	11.845	1.4150887
Total		0.0003962	100.000	4.1116869

-2 LogLikelihood = -743.5313686

**Response Ratio Probe Set=56. Cluster=3**

**REML Componentes de la varianza estimados**

Random Effect	Var Ratio	Var Component	Pct of Total	CV
Operator	0.036221	8.2358e-6	2.502	0.3039493

## Apéndices

Random Effect	Var Ratio	Var Component	Pct of Total	CV
Instrument	0.1286191	2.9245e-5	8.885	0.5727617
Day[Operator.Instrument]	0.0249695	5.6775e-6	1.725	0.2523631
Reagent Lot	0.2578283	5.8624e-5	17.810	0.8109358
Residual		0.0002274	69.078	1.5970597
Total		0.0003292	100.000	1.9215475

-2 LogLikelihood = -1174.440876

### Response Ratio Probe Set=58. Cluster=1

#### REML Componentes de la varianza estimados

Random Effect	Var Ratio	Var Component	Pct of Total	CV
Operator	0	0	0.000	0
Instrument	0	0	0.000	0
Day[Operator.Instrument]	0.876927	3.9065e-5	17.292	6.0119133
Reagent Lot	3.1944741	0.0001423	62.990	11.474418
Residual		4.4547e-5	19.718	6.4199404
Total		0.0002259	100.000	14.457559

-2 LogLikelihood = -730.1498602

**Response Ratio Probe Set=58. Cluster=3**

**REML Componentes de la varianza estimados**

Random Effect	Var Ratio	Var Component	Pct of Total	CV
Operator	0	0	0.000	0
Instrument	0.0574692	1.424e-5	4.864	0.4036517
Day[Operator.Instrument]	0	0	0.000	0
Reagent Lot	0.1241317	3.0758e-5	10.505	0.5932404
Residual		0.0002478	84.631	1.6837955
Total		0.0002928	100.000	1.8303104

-2 LogLikelihood = -1163.072846

**Response Ratio Probe Set=80. Cluster=3**

**REML Componentes de la varianza estimados**

Random Effect	Var Ratio	Var Component	Pct of Total	CV
Operator	0	0	0.000	0
Instrument	0.3651793	2.0277e-5	19.331	0.4677268
Day[Operator.Instrument]	0.4027596	2.2363e-5	21.320	0.4912042
Reagent Lot	0.121147	6.7267e-6	6.413	0.2693987
Residual		5.5525e-5	52.936	0.7739968
Total		0.0001049	100.000	1.0638123

-2 LogLikelihood = -2208.281805

### Response Ratio Probe Set=117. Cluster=1

#### REML Componentes de la varianza estimados

Random Effect	Var Ratio	Var Component	Pct of Total	CV
Operator	0	0	0.000	0
Instrument	0.5912908	4.0174e-5	22.464	12.597239
Day[Operator.Instrument]	0.123483	8.3897e-6	4.691	5.7567641
Reagent Lot	0.9173906	6.233e-5	34.853	15.691048
Residual		6.7942e-5	37.992	16.382297
Total		0.0001788	100.000	26.578551

-2 LogLikelihood = -700.4992015

### Response Ratio Probe Set=117. Cluster=2

#### REML Componentes de la varianza estimados

Random Effect	Var Ratio	Var Component	Pct of Total	CV
Operator	0	0	0.000	0
Instrument	0	0	0.000	0
Day[Operator.Instrument]	0.7864755	0.0001585	8.163	2.5800612
Reagent Lot	7.8477975	0.0015813	81.457	8.1500694
Residual		0.0002015	10.380	2.9092927

## Apéndices

Random Effect	Var Ratio	Var Component	Pct of Total	CV
Total		0.0019413	100.000	9.03019

-2 LogLikelihood = -567.931847

### Response Ratio Probe Set=117. Cluster=3

#### REML Componentes de la varianza estimados

Random Effect	Var Ratio	Var Component	Pct of Total	CV
Operator	0	0	0.000	0
Instrument	0.0563841	2.0787e-5	4.393	0.4877483
Day[Operator.Instrument]	0.0159645	5.8855e-6	1.244	0.2595341
Reagent Lot	0.211176	7.7852e-5	16.453	0.94393
Residual		0.0003687	77.910	2.0540807
Total		0.0004732	100.000	2.3271243

-2 LogLikelihood = -1074.121195

## Apéndices

APÉNDICE 10. RESUMEN DE LOS RESULTADOS PARA CADA FENOTIPO PREDICHO EN TODAS LAS MUESTRAS ANALIZADAS EN EL ESTUDIO DE TOLERANCIA A LA VARIABILIDAD EN EL PROTOCOLO (“GUARD BANDING”).

Antigen	Condition	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls %	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls %	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
D (RH1)	LOWER	D-	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
D (RH1)	LOWER	Weak D Type 1	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
D (RH1)	LOWER	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS
HPA-1a	LOWER	+	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
HPA-1a	LOWER	0	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
HPA-1b	LOWER	+	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS
HPA-1b	LOWER	0	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS
D (RH1)	UPPER	D-	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
D (RH1)	UPPER	Weak D Type 1	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS

## Apéndices

D (RH1)	UPPER	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS
HPA-1a	UPPER	+	9	9	100	≥95%	PASS	9	100	≥99%	PASS
HPA-1a	UPPER	0	3	3	100	≥95%	PASS	3	100	≥99%	PASS
HPA-1b	UPPER	+	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS
HPA-1b	UPPER	0	6	6	100	≥95%	PASS	6	100	≥99%	PASS

(\*) *RHD* gene present. *D-* (*RHD*\**DIIIa-CE(3-7)-D* or *RHD*\**Pseudogene* genotype not detected)

### APÉNDICE 11. CONDICIONES TESTADAS EN EL PASO DE AMPLIFICACIÓN DEL ADN (ESTUDIO DE TOLERANCIA A LA VARIABILIDAD EN EL PROTOCOLO (GUARD BANDING))”

Process	Process Step	Method	Key Input Parameter	Tested Guard Band Range
<b>Prepare PCR Master Mix</b>	Mix PCR Master Mix (MM)	Vortex at full speed	Time	3-5 sec
	Spin down PCR MM tubes	Pulse centrifugation at min speed (400 g)	Time	3-5 sec
<b>Prepare DNA Polymerase</b>	Mix DNA polymerase	Vortex at full speed	Time	3-5 sec
	Spin down DNA polymerase tubes	Pulse centrifugation at min speed (400 g)	Time	3-5 sec
<b>Prepare PCR reaction mix</b>	Mix PCR reaction mix	Vortex at full speed	Time	3-5 sec
	Spin down PCR reaction mix tubes	Pulse centrifugation at min speed (400g)	Time	3-5 sec
	PCR reaction mix, enzyme (Taq) volume	Manual pipetting	Volume	0.375-0.625 µl
<b>DNA control and test samples</b>	Mix DNA samples	Vortex at full speed	Time	3-5 sec
	Spin down DNA samples tubes	Pulse centrifugation at min speed (400 g)	Time	3-5 sec
<b>Prepare PCR plate</b>	Dispense of PCR reaction mix and addition of DNA samples	Manual pipetting	Time	Immediate dispensing - 60 min
<b>PCR reaction</b>	Spin down PCR reaction plate	Pulse centrifugation at min speed (400 g)	Time	3-5 sec
	PCR product stability	Storage at 4°C	Time and temperature	Immediate use-96h
		Storage at -20°C		5 weeks

## Apéndices

Process	Process Step	Method	Key Input Parameter	Tested Guard Band Range
	Polimerase Activation	PCR amplification program	Temperature	94-96°C
	Polimerase Activation	PCR amplification program	Time	13-17 min
	PCR cycles	PCR amplification program	Cycles	35-45
	Denaturation temperature	PCR amplification program	Temperature	94-96°C
	Denaturation time	PCR amplification program	Time	26-34 seconds
	Annealing temperature	PCR amplification program	Temperature	59-61°C
	Annealing time	PCR amplification program	Time	26-34 seconds
	Extension temperature	PCR amplification program	Temperature	71-73°C
	Extension time	PCR amplification program	Time	70-90 seconds
	Final Extension temperature	PCR amplification program	Temperature	71-73°C
	Final Extension time	PCR amplification program	Time	6-8 min

APÉNDICE 12. CONDICIONES TESTADAS EN EL PASO DE HIBRIDACIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO (ESTUDIO DE TOLERANCIA A LA VARIABILIDAD EN EL PROTOCOLO (GUARD BANDING))”

Process	Process Step	Method	Key Input Parameter	Test Cases
<b>Prepare hybridization plate</b>	Mix Bead MM	Vortex at full speed	Time	10-15 sec
	Spin down PCR product plate	Pulse centrifugation at min speed (400 g)	Time	3-5 sec
	Dispense Beads MM and addition of PCR product	Manual pipetting	Time	Immediate dispensing-30 min
	Dispense Beads MM	Manual pipetting	Volume	34.5-57.5 $\mu$ l
	Addition of PCR product	Manual pipetting	Volume	3-5 $\mu$ l
<b>Hybridization reaction</b>	Denaturation reaction	Denaturation reaction: 2min	Time	1-3 min
	Denaturation reaction	Denaturation reaction: 95°C	Temperature	94-96°C
	Run hybridization reaction	Incubation at 52°C on thermal cycler	Time	25-35 min
	Run hybridization reaction	Incubation at 52°C on thermal cycler	Temperature	51-53°C
	Hold	Incubation at 52°C on thermal cycler	Temperature	51-53°C

### APÉNDICE 13. CONDICIONES TESTADAS EN EL PASO DE MARCAJE (ESTUDIO DE TOLERANCIA A LA VARIABILIDAD EN EL PROTOCOLO (GUARD BANDING))

Process	Process Step	Method	Key Input Parameter	Test Cases
<b>Prepare SAPE</b>	Mix SAPE and SAPE dilution Buffer	Vortex at full speed	Time	3-5 sec
	Spin down SAPE	Pulse centrifugation at min speed (400 g)	Time	3-5 sec
<b>Prepare labeling plate</b>	Prepare the Labeling Mix, volume of SAPE	Manual pipetting	Volume	2.25-3.75 $\mu$ l
	Mix Labeling Mix	Vortex at full speed	Time	3-5 sec
	Keep Labeling Mix until dispensing	Storing in the dark	Time	30-35 min
	Dispense Labeling mix	Manual pipetting	Time	Immediate dispensing - 5 min
<b>Labeling reaction</b>	Run labeling reaction	Incubation at 52°C on thermal cycler	Time	8-12 min
	Run labeling reaction	Incubation at 52°C on thermal cycler	Temperature	51-53°C

APÉNDICE 14. CONDICIONES TESTADAS EN EL PASO DE ADQUISICIÓN DE DATOS CON LUMINEX (ESTUDIO DE TOLERANCIA A LA VARIABILIDAD EN EL PROTOCOLO (GUARD BANDING))”

Process	Process Step	Method	Key Input Parameter	Test Cases
<b>Data acquisition on Luminex</b>	Maximum transferring time from labeling to Luminex instrument	Incubation at room temperature	Time	Immediate transferring- 10 min
	Temperature of data acquisition on Luminex	Incubation at 52°C on Luminex	Temperature	51-53°C

## APÉNDICE 15. RESUMEN DE LOS RESULTADOS PARA CADA FENOTIPO PREDICHO EN TODAS LAS MUESTRAS ANALIZADAS EN EL ESTUDIO DE ESTABILIDAD A TEMPERATURAS EXTREMAS “ESTRÉS”

Antigen	Time-point	Stress condition	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
D (RH1)	T9	SC1	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T9	SC1	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T9	SC1	Weak D Types 1, 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T9	SC1	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T9	SC1	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T9	SC1	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T9	SC1	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T9	SC2	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T9	SC2	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T9	SC2	Weak D Types 1, 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T9	SC2	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Time-point	Stress condition	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
HPA-1a	T9	SC2	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T9	SC2	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T9	SC2	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T12	SC1	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T12	SC1	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T12	SC1	Weak D Types 1, 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T12	SC1	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T12	SC1	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T12	SC1	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T12	SC1	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T12	SC2	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T12	SC2	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Time-point	Stress condition	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
D (RH1)	T12	SC2	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T12	SC2	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T12	SC2	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T12	SC2	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T12	SC2	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T13	SC1	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T13	SC1	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T13	SC1	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T13	SC1	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T13	SC1	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T13	SC1	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T13	SC1	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Time-point	Stress condition	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
D (RH1)	T13	SC2	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T13	SC2	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T13	SC2	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T13	SC2	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T13	SC2	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T13	SC2	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T13	SC2	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T15	SC1	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T15	SC1	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T15	SC1	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T15	SC1	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T15	SC1	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Time-point	Stress condition	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
HPA-1b	T15	SC1	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T15	SC1	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T15	SC2	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T15	SC2	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T15	SC2	Weak D Types 1, 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T15	SC2	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T15	SC2	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T15	SC2	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T15	SC2	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T16	SC1	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T16	SC1	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T16	SC1	Weak D Types 1, 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Time-point	Stress condition	Predicted Phenotype	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
HPA-1a	T16	SC1	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T16	SC1	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T16	SC1	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T16	SC1	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T16	SC2	D-	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T16	SC2	Weak D Type 1	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
D (RH1)	T16	SC2	Weak D Types 1, 2 or 3 not detected (*)	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T16	SC2	+	60	60	100%	≥95%	PASS	60	100%	≥99%	PASS
HPA-1a	T16	SC2	0	20	20	100%	≥95%	PASS	20	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T16	SC2	+	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS
HPA-1b	T16	SC2	0	40	40	100%	≥95%	PASS	40	100%	≥99%	PASS

(\*) *RHD* gene present. D- (*RHD*\*DIIIa-CE(3-7)-D or *RHD*\*Pseudogene genotype not detected)

## Apéndices

### APÉNDICE 16. RESUMEN DE LOS RESULTADOS PARA CADA FENOTIPO PREDICHO EN TODAS LAS MUESTRAS ANALIZADAS EN EL ESTUDIO DE REPRODUCIBILIDAD

Antigen	Site	Run_Day	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
D (RH1)	S1	Run 1 Day 1	16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
HPA-1a			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
HPA-1b			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
D (RH1)		Run 2 Day 8	16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
HPA-1a			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
HPA-1b			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
D (RH1)		Run 3 Day 10 & Run 7 Day 24	16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
HPA-1a			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
HPA-1b			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
D (RH1)		Run 4 Day 15	16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Site	Run_Day	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL	
HPA-1a			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS	
HPA-1b			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS	
D (RH1)		Run 6 Day 22	16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS	
HPA-1a			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS	
HPA-1b			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS	
D (RH1)		Run 8 Day 30	16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS	
HPA-1a			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS	
HPA-1b			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS	
D (RH1)		S2	Run 1 Day 1	16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
HPA-1a				16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
HPA-1b				16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Site	Run_Day	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
D (RH1)		Run 2 Day 7	16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
HPA-1a			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
HPA-1b			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
D (RH1)		Run 3 Day 9	16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
HPA-1a			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
HPA-1b			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
D (RH1)		Run 4 Day 15	16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
HPA-1a			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
HPA-1b			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
D (RH1)		Run 5 Day 17	16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
HPA-1a			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Site	Run_Day	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
HPA-1b			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
D (RH1)		Run 6 Day 21	16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
HPA-1a			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
HPA-1b			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
D (RH1)	S3	Run 1 Day 1	16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
HPA-1a			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
HPA-1b			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
D (RH1)		Run 2 Day 6	16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
HPA-1a			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
HPA-1b			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
D (RH1)		Run 3 Day 13	16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS

## Apéndices

Antigen	Site	Run_Day	Number Calls Performed	Number Calls Observed	Observed Percent Calls	Criteria of percent call for PASS	PASS/FAIL	Number Correct Calls Observed	Observed Percent Correct Calls	Criteria of correct calls percent for PASS	PASS/FAIL
HPA-1a			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
HPA-1b			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
D (RH1)		Run 4 REP Day 17	16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
HPA-1a			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
HPA-1b			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
D (RH1)		Run 5 Day 20	16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
HPA-1a			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
HPA-1b			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
D (RH1)		Run 6 Day 23	16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
HPA-1a			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS
HPA-1b			16	16	100	≥95%	PASS	16	100	≥99%	PASS

## Apéndices

APÉNDICE 17. RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS CON EL TEST ID RHD XT *VERSUS* LOS RESULTADOS DE SEROLOGÍA EN EL ESTUDIO EVALUACIÓN DEL TEST A PARTIR DE MUESTRAS INDIVIDUALES.

Blood Center	Sample type	Blinding Code	Serology RHD	Serology D	Serology DU	Predicted Phenotype Result	Concordance with Serology	Stock repetition	Bi-directional Seq Result	Concordance with Bi-directional Seq
CVTTH	Donor	TDRHDPE010891	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010820	+	+		Weak D Type 3	Discrepant		Weak D Type 3	Concordant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010314	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010630	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010650	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010319	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010432	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010331	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010734	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010727	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010368	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010875	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010133	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010988	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010938	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010877	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010860	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010099	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010092	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010345	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010651	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010349	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010270	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010788	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010131	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010253	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010721	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010713	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010394	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010475	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010470	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010193	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010051	+	+	+	Weak D Type 3	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010679	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010541	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010251	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010391	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010996	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010054	+	+	+	Weak D Type 1	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010872	+	+		No amplification variant detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010687	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010359	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010482	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010266	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010340	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010157	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010889	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010591	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010589	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010968	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010310	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010035	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010016	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010642	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010493	-	-	-	No amplification variant detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010520	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010593	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010220	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010937	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010423	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010984	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010228	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010901	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010004	+	+	+	Weak D Type 2	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010833	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010401	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010720	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010550	+	+	+	Weak D Type 2	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010653	-		-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010772	+	+	+	Weak D Type 2	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010537	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010434	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010489	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010940	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010144	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010981	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010158	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010260	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010992	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010146	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010742	+	+	+	Weak D Type 1	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010619	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010927	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010265	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010985	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010188	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010526	+	+	+	Weak D Type 1	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010408	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010246	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010043	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010848	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	WeakD	TDRHDPE010880	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010383	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010108	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010677	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010805	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010584	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010671	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010369	+	+	+	Weak D Type 1	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010879	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010739	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010177	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010696	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010083	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010236	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010474	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010422	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010605	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010524	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010757	-	-	-	No amplification variant detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010878	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010169	+	+	+	Weak D Type 3	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010218	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010516	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010168	+	+	+	Weak D Type 3	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010071	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010515	-		-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010812	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010141	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010895	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010648	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010395	+	+	+	Weak D Type 3	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010372	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010942	+	+	+	Weak D Type 3	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010081	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010633	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010695	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010761	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010693	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010445	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010956	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010639	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010784	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010919	+	+	+	Weak D Type 1	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010076	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010237	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010022	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010137	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010816	+	+	+	Weak D Type 3	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010815	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010711	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010513	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010067	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010609	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010946	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010729	+	+	+	Weak D Type 3	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010817	+	+	+	Weak D Type 3	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010849	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010731	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010466	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010863	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010274	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010965	-		-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010775	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		weak D type 4 (BLOODchip REFERENCE)	Concordant

## Apéndices

CVTTH	WeakD	TDRHDPE010115	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010684	+	+	+	Weak D Type 2	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010056	+	+	+	Weak D Type 3	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010230	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010074	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010566	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010060	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010174	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010227	+	+	+	Weak D Type 3	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010495	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010338	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010674	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010501	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010943	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010843	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010183	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010688	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010656	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010377	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010411	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010492	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010223	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010539	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010569	+	+	+	Weak D Type 3	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010199	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010611	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010726	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010210	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010928	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010983	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010917	+	+	+	Weak D Type 1	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010103	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010089	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010595	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010700	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010973	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010047	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010990	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010662	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010916	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010557	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010858	+	+	+	Weak D Type 1	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010783	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010737	-		-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010857	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordant
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010792	+	+		Weak D Type 3	Discrepant		Weak D Type 3 (HPA1a1b)	Concordant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010191	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010780	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010686	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010759	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010481	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010978	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010608	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010180	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010585	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010826	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010094	+	+	+	Weak D Type 1	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010387	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010719	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010529	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010077	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010413	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010998	-	-	-	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010178	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010831	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010435	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010192	+		+	Weak D Type 2	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010198	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010790	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010363	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010847	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010243	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	WeakD	TDRHDPE010438	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010864	-	-	-	No amplification variant detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010670	+	+	+	Weak D Type 2	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010429	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010842	-	-	-	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010380	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010143	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010121	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010181	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010390	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010454	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010499	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010415	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010163	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010306	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010386	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010404	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010839	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010782	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010798	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010479	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010991	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010305	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010447	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010663	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010063	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010064	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010934	+	+	+	Weak D Type 1	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010443	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010297	-	-	-	No amplification variant detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010361	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010972	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010944	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010336	+	+	+	Weak D Type 2	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010813	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010766	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010604	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010930	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010254	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010375	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010102	+	+	+	Weak D Type 1	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010652	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010484	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant

## Apéndices

CVTTH	WeakD	TDRHDPE010781	+	+	+	Weak D Type 1	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010568	+	+	+	Weak D Type 1	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010962	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010873	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010275	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010233	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010202	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010240	+	+	-	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010008	+	+	+	Weak D Type 1	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010132	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010970	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010086	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010105	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010586	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010871	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010874	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010573	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010419	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010312	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010834	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010247	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010623	+		+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010620	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010171	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010480	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010800	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010194	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010341	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010555	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010661	+	+	+	Weak D Type 3	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010126	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010156	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010597	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	WeakD	TDRHDPE010019	+	+	+	Weak D Type 1	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010057	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010138	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010701	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010795	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010221	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010110	+	+	+	Weak D Type 1	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010497	+	+	+	No amplification variant detected (9)	Concordant		No amplification variant detected (*)	Concordant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010939	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010287	+	+	+	Weak D Type 2	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010294	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010490	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010829	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010280	+	+	+	Weak D Type 3	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010521	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010518	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010234	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010519	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010258	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010678	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010129	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010093	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010235	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010507	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010565	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010658	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010337	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010552	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010545	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010627	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010284	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010749	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010449	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010810	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010496	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010159	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010184	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010657	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010924	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010583	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010140	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010114	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	WeakD	TDRHDPE010853	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010602	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010562	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010821	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010865	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010614	+	+	+	Weak D Type 3	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010753	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010744	-	-	-	No amplification variant detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010257	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010161	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010542	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010932	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010248	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010796	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010128	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010811	+	+	+	Weak D Type 1	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010961	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010348	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010599	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010587	+	+	+	Weak D Type 2	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010172	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010045	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010241	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010187	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010866	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010463	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010752	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010478	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010357	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010437	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010923	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010626	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010952	-	-	-	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordant
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010091	+	+	+	Weak D Type 3	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010072	+	+	+	Weak D Type 3	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010774	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010291	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010908	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010005	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010179	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010320	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010801	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010025	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010229	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010836	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010606	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010311	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010697	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010976	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010522	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010954	+	+	+	Weak D Type 1	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010055	+	+	+	Weak D Type 2	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010785	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010027	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010471	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010457	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010517	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010598	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010575	+	+	+	Weak D Type 2	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010960	+	+	+	Weak D Type 3	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010549	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010217	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010544	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010225	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010215	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010728	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010705	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010231	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010736	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010708	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010881	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010088	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010162	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010485	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010958	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010104	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010428	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010424	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010572	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010139	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010153	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010764	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010170	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010714	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010206	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010768	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010659	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010887	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010902	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010809	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010399	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010588	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010459	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010494	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010959	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010756	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010469	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010376	+	+	+	Weak D Type 2	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010622	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010888	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010293	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010398	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010717	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010079	-	-	-	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010769	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010304	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010020	+	+	+	Weak D Type 2	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010807	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010295	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010433	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010012	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010548	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010632	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010418	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010745	-	-	-	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010947	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010030	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010596	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010303	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010080	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010407	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010107	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010884	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010353	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010882	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010007	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010078	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010498	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010846	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010388	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010986	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010660	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010261	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010308	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010533	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010534	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010101	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010339	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010778	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010547	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010949	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010702	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010130	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010367	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010861	-	-	-	No amplification variant detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010762	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010024	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010328	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010249	-	-	-	No amplification variant detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010559	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010758	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010302	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010026	-		-	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010468	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010222	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010600	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010543	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010013	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010224	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010897	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010263	+	+	+	Weak D Type 1	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010898	+		+	Weak D Type 2	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010296	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010124	+	+		Weak D Type 3	Discrepant		Weak D Type 3	Concordant
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010691	+	+	+	Weak D Type 3	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010410	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010082	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010913	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010442	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010097	+	+	+	No amplification variant detected (9)	Concordant		No amplification variant detected (*)	Concordant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010933	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010066	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010462	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010451	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010754	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010612	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010385	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010835	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010242	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010724	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010607	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010155	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010402	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010160	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010941	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010625	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010914	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010777	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010100	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010042	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010483	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010514	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010318	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010360	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010420	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010031	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010403	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010669	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010166	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010062	+	+	+	Weak D Type 3	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010374	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010869	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010209	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010009	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010467	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010683	+	+	+	Weak D Type 2	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010075	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010238	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010760	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010704	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010613	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010069	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010528	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010867	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010771	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010580	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010716	+	+	+	Weak D Type 3	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010654	+	+	+	Weak D Type 3	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010738	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010392	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010856	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010096	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010250	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010256	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010456	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010563	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010554	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010886	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010718	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010725	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010906	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010111	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010321	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010300	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010185	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010325	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010712	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010512	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010870	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010989	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010635	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010994	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010307	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010309	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010342	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010971	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010579	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010400	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010464	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010120	-		-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010636	+	+	+	Weak D Type 3	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010189	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010912	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010883	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010926	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010535	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010173	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010440	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010036	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010053	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010014	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010186	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010326	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010668	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010226	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010259	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010935	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010957	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010010	+	+	+	Weak D Type 3	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010298	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010706	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010999	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010087	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010397	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010950	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010208	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010488	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010982	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010084	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010034	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010029	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010211	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010286	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010276	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010384	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010900	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010527	+	+		D-	Discrepant	Stock 2 and blinded aliquot wrong. Stock 1 ok		Concordant
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010936	+	+	+	Weak D Type 2	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010461	+	+	+	Weak D Type 3	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010371	-		-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010409	+		+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010564	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010048	-	-	-	No amplification variant detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010041	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010740	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010292	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010090	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010412	+	+	+	Weak D Type 2	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010540	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010396	-		-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010617	-		-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010214	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010037	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010628	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010948	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010824	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010640	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010406	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010647	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010213	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010748	+	+	+	No amplification variant detected (9)	Concordant		No amplification variant detected (*)	Concordant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010793	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010095	+	+	+	Weak D Type 3	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010838	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010794	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010511	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010334	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010382	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010896	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010364	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010239	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010426	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010343	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010536	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010285	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010787	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010709	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010710	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010504	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010925	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010389	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010802	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010164	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010052	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010806	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010073	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010905	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010502	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010641	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010109	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010699	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010365	+	+	+	Weak D Type 3	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010911	-	-	-	No amplification variant detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010676	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010722	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010692	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010195	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010868	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010288	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010624	-		-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010038	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010553	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010509	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010732	+	+	+	Weak D Type 3	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010299	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010113	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010525	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010837	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010786	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010963	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010486	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010974	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010204	+	+		Weak D Type 1 or D+	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010953	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010823	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010951	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010791	+	+	+	Weak D Type 2	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010040	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010610	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010176	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010058	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010680	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010558	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010995	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010964	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010819	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010332	+	+	+	Weak D Type 1	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010190	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010643	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010698	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010044	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010773	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010560	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010531	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010347	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010119	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010618	-	-	-	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010272	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010854	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010175	-	-	-	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D type 11 (HPA1a1b)	Concordant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010203	-		-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	WeakD	TDRHDPE010672	+		+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010277	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010245	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010920	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010216	+		+	Weak D Type 3	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010804	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010603	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010993	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010904	-	-	-	No amplification variant detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010003	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010532	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010546	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010477	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010862	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010452	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010673	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010207	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010510	+	+	+	Weak D Type 3	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010264	-	-	-	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010808	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010006	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010068	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010629	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010797	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010453	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010503	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010675	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010907	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010436	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010500	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010448	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010330	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010165	-	-	-	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant	Stock 2 and blinded aliquot wrong. Stock 1 ok		Concordant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010730	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010290	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010556	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010690	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010827	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010125	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010590	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010681	+	+	+	Weak D Type 3	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010335	+	+	+	Weak D Type 2	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010212	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010268	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010065	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010167	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010439	+	+		Weak D Type 2 or D+	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010032	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010922	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010578	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010715	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010356	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010381	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010997	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010313	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010327	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010017	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010921	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010134	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010028	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010561	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010487	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010021	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010279	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010664	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010352	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010232	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010689	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010918	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010876	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010592	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010070	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010219	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010818	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010370	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010841	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010755	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010582	-		-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010844	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010244	+	+	+	Weak D Type 2	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010551	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010508	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010142	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010117	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010011	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010450	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010373	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010346	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010803	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010694	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	WeakD	TDRHDPE010852	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010570	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010362	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010967	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010317	+	+	+	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
CVTTH	Donor	TDRHDPE010767	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010200	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010393	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010151	-	-	-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010637	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010271	-		-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010646	+	+	+	Weak D Type 2	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010909	+	+	-	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010421	+	+		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010278	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	WeakD	TDRHDPE010472	+	+	+	Weak D Type 2	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010358	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010122	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010763	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010530	-	-	-	D-	Concordant			
CVTTH	Donor	TDRHDPE010267	-		-	D-	Concordant			

## Apéndices

CVTTH	Donor	TDRHDPE010002	-	-	-	D-	Concordant			
SBS	New born	TDRHDPE010196	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
SBS	New born	TDRHDPE010538	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
SBS	New born	TDRHDPE010977	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
SBS	New born	TDRHDPE010855	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
SBS	New born	TDRHDPE010425	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
SBS	New born	TDRHDPE010458	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
SBS	New born	TDRHDPE010301	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
SBS	New born	TDRHDPE010685	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
SBS	New born	TDRHDPE010033	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

SBS	New born	TDRHDPE010316	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
SBS	New born	TDRHDPE010893	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
SBS	New born	TDRHDPE010743	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
SBS	New born	TDRHDPE010571	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
SBS	New born	TDRHDPE010098	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
SBS	New born	TDRHDPE010255	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
SBS	New born	TDRHDPE010929	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
SBS	New born	TDRHDPE010634	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
SBS	New born	TDRHDPE010615	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

SBS	New born	TDRHDPE010049	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
SBS	New born	TDRHDPE010154	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	WeakD	TDRHDPE010378	D/P			Weak D Type 2	Concordant			
BSTA	WeakD	TDRHDPE010825	D d/p			Weak D Type 2	Concordant			
BSTA	Donor	TDRHDPE010789	-			D-	Concordant			
BSTA	Donor	TDRHDPE010665	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Donor	TDRHDPE010703	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Donor	TDRHDPE010127	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	WeakD	TDRHDPE010046	D/P			Weak D Type 2	Concordant			
BSTA	Donor	TDRHDPE010355	-			D-	Concordant			
BSTA	Donor	TDRHDPE010828	-			D-	Concordant			

## Apéndices

BSTA	Donor	TDRHDPE010430	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	WeakD	TDRHDPE010269	D/P			Weak D Type 2	Concordant			
BSTA	Donor	TDRHDPE010281	-			D-	Concordant			
BSTA	Donor	TDRHDPE010085	-			D-	Concordant			
BSTA	WeakD	TDRHDPE010324	D/P			Weak D Type 2	Concordant			
BSTA	Donor	TDRHDPE010645	-			D-	Concordant			
BSTA	Donor	TDRHDPE010354	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Donor	TDRHDPE010945	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	WeakD	TDRHDPE010135	D/P			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
BSTA	Donor	TDRHDPE010723	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

BSTA	Donor	TDRHDPE010059	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Donor	TDRHDPE010427	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	WeakD	TDRHDPE010577	D d/p			Weak D Type 3	Concordant			
BSTA	Donor	TDRHDPE010505	-			D-	Concordant			
BSTA	WeakD	TDRHDPE010885	D/P			Weak D Type 2	Concordant			
BSTA	WeakD	TDRHDPE010414	D/P			Weak D Type 2	Concordant			
BSTA	WeakD	TDRHDPE010148	D/P			Weak D Type 1	Concordant			
BSTA	WeakD	TDRHDPE010830	D/P			Weak D Type 2	Concordant			
BSTA	WeakD	TDRHDPE010765	D/P			Weak D Type 1	Concordant			
BSTA	WeakD	TDRHDPE010333	D/P			Weak D Type 2	Concordant			
BSTA	WeakD	TDRHDPE010182	D p VI			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant

## Apéndices

BSTA	WeakD	TDRHDPE010616	D/P			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Discrepant		Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Discrepant
BSTA	WeakD	TDRHDPE010915	D/P			Weak D Type 1	Concordant			
BSTA	WeakD	TDRHDPE010061	D/P			Weak D Type 2	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010118	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010112	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010344	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010431	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010460	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010751	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010975	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

BSTA	Patient	TDRHDPE010289	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010446	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010966	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010814	-			D-	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010799	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010735	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010638	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010405	-			D-	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010850	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010116	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

BSTA	Patient	TDRHDPE010201	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010205	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010931	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010283	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010379	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010979	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010567	-			D-	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010741	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010123	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE011000	-			D-	Concordant			

## Apéndices

BSTA	Patient	TDRHDPE010576	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010150	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010621	-			D-	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010890	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010851	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010594	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010644	-			No amplification variant detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010733	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010655	-			D-	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010894	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

BSTA	Patient	TDRHDPE010969	+			Weak D Type 3 or D+	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010262	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010822	-			D-	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010152	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010322	-			D-	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010039	-			D-	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010329	-			D-	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010770	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010444	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010955	-			D-	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010315	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

BSTA	Patient	TDRHDPE010747	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010491	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010601	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010149	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010682	-			D-	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010666	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010136	-			D-	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010523	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010506	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010001	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

BSTA	Patient	TDRHDPE010649	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010252	-			D-	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010323	-			D-	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010050	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010441	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010845	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010416	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010145	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010581	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010631	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

BSTA	Patient	TDRHDPE010350	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010473	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010465	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010282	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010197	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010750	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010417	-			D-	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010859	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010707	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010015	-			D-	Concordant			

## Apéndices

BSTA	Patient	TDRHDPE010273	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010147	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010899	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010746	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010106	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010574	-			D-	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010910	-			D-	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010892	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010980	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010455	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

BSTA	Patient	TDRHDPE010776	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010840	-			D-	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010987	-			D-	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010476	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010667	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010366	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010903	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010779	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010023	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010018	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

## Apéndices

BSTA	Patient	TDRHDPE010832	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			
BSTA	Patient	TDRHDPE010351	+			Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (9)	Concordant			

APÉNDICE 18. RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS CON EL TEST ID RHD XT *VERSUS* LOS RESULTADOS DE SECUENCIACIÓN BIDIRECCIONAL EN EL ESTUDIO EVALUACIÓN DEL TEST A PARTIR DE MUESTRAS INDIVIDUALES.

Blinding Code	PS1 3_F	PS1 3_R	PS 13	PS5 6_F	PS5 6_R	PS 56	PS5 8_F	PS5 8_R	PS 58	PS8 0_F	PS8 0_R	PS 80	PS 193	PS1 17_F	PS11 7_R	PS 117	Seq Phenotype _D (RH1)	ID RHD XT Predicted Phenotype Result	D (RH1) Concordance	HPA-1a Seq Phenotype	HPA-1b Seq Phenotype	HPA-1a Predicted Phenotype Result	HPA-1b Predicted Phenotype Result	HPA-1a Concordance	HPA-1b Concordance
TDRHDP E010820	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	Y	Y	2	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concordant	+	+	+	+	Concordant	Concordant
TDRHDP E010938	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	Y	Y	2	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordant	+	+	+	+	Concordant	Concordant
TDRHDP E010349	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordant	+	0	+	0	Concordant	Concordant
TDRHDP E010270	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordant	+	0	+	0	Concordant	Concordant
TDRHDP E010131	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordant	+	0	+	0	Concordant	Concordant
TDRHDP E010051	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concordant	+	0	+	0	Concordant	Concordant
TDRHDP E010679	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordant	+	0	+	0	Concordant	Concordant

## Apéndices

TDRHDP E010054	C	C	3	T	T	3	G	G	1	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 1	Weak D Type 1	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010687	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010482	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	Y	Y	2	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	+	+	+	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010220	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010937	C	C	3	C	T	3	T	T	3	G	G	3	A	Y	Y	2	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	+	+	+	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010004	C	C	3	T	T	3	T	T	3	C	C	1	A	C	C	1	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concor dant	0	+	0	+	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010833	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	Y	Y	2	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	+	+	+	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010720	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010550	C	C	3	T	T	3	T	T	3	C	C	1	A	Y	Y	2	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concor dant	+	+	+	+	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010772	C	C	3	T	T	3	T	T	3	C	C	1	A	T	T	3	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant

# Apéndices

TDRHDP E010489	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010992	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010742	C	C	3	T	T	3	G	G	1	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 1	Weak D Type 1	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010526	C	C	3	T	T	3	G	G	1	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 1	Weak D Type 1	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010880	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010369	C	C	3	T	T	3	G	G	1	G	G	3	A	Y	Y	2	Weak D Type 1	Weak D Type 1	Concor dant	+	+	+	+	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010879	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010524	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010169	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010516	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant

## Apéndices

TDRHDP E010168	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	Y	Y	2	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concor dant	+	+	+	+	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010071	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	Y	Y	2	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	+	+	+	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010812	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010395	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010942	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	Y	Y	2	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concor dant	+	+	+	+	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010919	C	C	3	T	T	3	G	G	1	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 1	Weak D Type 1	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010137	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010816	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010729	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010817	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	Y	Y	2	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concor dant	+	+	+	+	Concor dant	Concor dant

## Apéndices

TDRHDP E010849	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordant	+	0	+	0	Concordant	Concordant
TDRHDP E010731	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	Y	Y	2	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordant	+	+	+	+	Concordant	Concordant
TDRHDP E010466	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	Y	Y	2	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordant	+	+	+	+	Concordant	Concordant
TDRHDP E010775	No result																No result*	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)		No result*	No result*	+	0		
TDRHDP E010115	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordant	+	0	+	0	Concordant	Concordant
TDRHDP E010684	C	C	3	T	T	3	T	T	3	C	C	1	A	T	T	3	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concordant	+	0	+	0	Concordant	Concordant
TDRHDP E010056	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	Y	Y	2	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concordant	+	+	+	+	Concordant	Concordant
TDRHDP E010074	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordant	+	0	+	0	Concordant	Concordant
TDRHDP E010227	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	Y	Y	2	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concordant	+	+	+	+	Concordant	Concordant
TDRHDP E010843	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	Y	Y	2	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordant	+	+	+	+	Concordant	Concordant

## Apéndices

TDRHDP E010492	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010569	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010726	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010917	C	C	3	T	T	3	G	G	1	G	G	3	A	Y	Y	2	Weak D Type 1	Weak D Type 1	Concor dant	+	+	+	+	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010973	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010858	C	C	3	T	T	3	G	G	1	G	G	3	A	Y	Y	2	Weak D Type 1	Weak D Type 1	Concor dant	+	+	+	+	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010857	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010792	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	Y	Y	2	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concor dant	+	+	+	+	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010780	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010094	C	C	3	T	T	3	G	G	1	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 1	Weak D Type 1	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant

## Apéndices

TDRHDP E010077	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010192	C	C	3	T	T	3	T	T	3	C	C	1	A	T	T	3	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010438	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010670	C	C	3	T	T	3	T	T	3	C	C	1	A	Y	Y	2	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concor dant	+	+	+	+	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010934	C	C	3	T	T	3	G	G	1	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 1	Weak D Type 1	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010336	C	C	3	T	T	3	T	T	3	C	C	1	A	Y	Y	2	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concor dant	+	+	+	+	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010102	C	C	3	T	T	3	G	G	1	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 1	Weak D Type 1	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010484	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	C	C	1	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	0	+	0	+	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010781	C	C	3	T	T	3	G	G	1	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 1	Weak D Type 1	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010568	C	C	3	T	T	3	G	G	1	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 1	Weak D Type 1	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant

## Apéndices

TDRHDP E010008	C	C	3	T	T	3	G	G	1	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 1	Weak D Type 1	Concordant	+	0	+	0	Concordant	Concordant
TDRHDP E010623	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordant	+	0	+	0	Concordant	Concordant
TDRHDP E010661	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concordant	+	0	+	0	Concordant	Concordant
TDRHDP E010019	C	C	3	T	T	3	G	G	1	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 1	Weak D Type 1	Concordant	+	0	+	0	Concordant	Concordant
TDRHDP E010057	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	Y	Y	2	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordant	+	+	+	+	Concordant	Concordant
TDRHDP E010110	C	C	3	T	T	3	G	G	1	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 1	Weak D Type 1	Concordant	+	0	+	0	Concordant	Concordant
TDRHDP E010497	C	C	3	0	0	A	0	0	A	G	G	3	A	T	T	3	No amplification variant detected (*)	No amplification variant detected (*)	Concordant	+	0	+	0	Concordant	Concordant
TDRHDP E010287	C	C	3	T	T	3	T	T	3	C	C	1	A	T	T	3	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concordant	+	0	+	0	Concordant	Concordant
TDRHDP E010829	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordant	+	0	+	0	Concordant	Concordant
TDRHDP E010280	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	Y	Y	2	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concordant	+	+	+	+	Concordant	Concordant

## Apéndices

TDRHDP E010258	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010552	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	Y	Y	2	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	+	+	+	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010627	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	Y	Y	2	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	+	+	+	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010853	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	Y	Y	2	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	+	+	+	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010614	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010796	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	Y	Y	2	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	+	+	+	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010811	C	C	3	T	T	3	G	G	1	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 1	Weak D Type 1	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010587	C	C	3	T	T	3	T	T	3	C	C	1	A	T	T	3	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010091	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010072	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant

## Apéndices

TDRHDP E010179	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010976	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	Y	Y	2	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	+	+	+	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010522	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010954	C	C	3	T	T	3	G	G	1	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 1	Weak D Type 1	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010055	C	C	3	T	T	3	T	T	3	C	C	1	A	T	T	3	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010457	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	Y	Y	2	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	+	+	+	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010575	C	C	3	T	T	3	T	T	3	C	C	1	A	T	T	3	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010960	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010705	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010376	C	C	3	T	T	3	T	T	3	C	C	1	A	T	T	3	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant

## Apéndices

TDRHDP E010020	C	C	3	T	T	3	T	T	3	C	C	1	A	T	T	3	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010632	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010418	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010778	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010222	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010263	C	C	3	T	T	3	G	G	1	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 1	Weak D Type 1	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010898	C	C	3	T	T	3	T	T	3	C	C	1	A	T	T	3	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010124	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010691	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010097	C	C	3	0	0	A	0	0	A	G	G	3	A	C	C	1	No amplification variant detected (*)	No amplification variant detected (*)	Concor dant	0	+	0	+	Concor dant	Concor dant

## Apéndices

TDRHDP E010754	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010062	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010683	C	C	3	T	T	3	T	T	3	C	C	1	A	T	T	3	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010238	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010760	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010716	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010654	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010738	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010256	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010971	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant

## Apéndices

TDRHDP E010636	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concordant	+	0	+	0	Concordant	Concordant
TDRHDP E010326	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	Y	Y	2	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordant	+	+	+	+	Concordant	Concordant
TDRHDP E010010	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concordant	+	0	+	0	Concordant	Concordant
TDRHDP E010936	C	C	3	T	T	3	T	T	3	C	C	1	A	Y	Y	2	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concordant	+	+	+	+	Concordant	Concordant
TDRHDP E010461	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concordant	+	0	+	0	Concordant	Concordant
TDRHDP E010409	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concordant	+	0	+	0	Concordant	Concordant
TDRHDP E010412	C	C	3	T	T	3	T	T	3	C	C	1	A	T	T	3	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concordant	+	0	+	0	Concordant	Concordant
TDRHDP E010748	C	C	3	0	0	A	0	0	A	G	G	3	A	Y	Y	2	No amplification variant detected (*)	No amplification variant detected (*)	Concordant	+	+	+	+	Concordant	Concordant
TDRHDP E010095	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	C	C	1	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concordant	0	+	0	+	Concordant	Concordant
TDRHDP E010365	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concordant	+	0	+	0	Concordant	Concordant

## Apéndices

TDRHDP E010732	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010791	C	C	3	T	T	3	T	T	3	C	C	1	A	T	T	3	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010332	C	C	3	T	T	3	G	G	1	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 1	Weak D Type 1	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010672	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010216	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010003	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010510	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010827	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	Y	Y	2	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	+	+	+	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010681	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	Y	Y	2	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concor dant	+	+	+	+	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010335	C	C	3	T	T	3	T	T	3	C	C	1	A	T	T	3	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant

## Apéndices

TDRHDP E010268	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010244	C	C	3	T	T	3	T	T	3	C	C	1	A	Y	Y	2	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concor dant	+	+	+	+	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010142	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010117	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010852	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010362	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010317	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010646	C	C	3	T	T	3	T	T	3	C	C	1	A	T	T	3	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010472	C	C	3	T	T	3	T	T	3	C	C	1	A	T	T	3	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010378	C	C	3	T	T	3	T	T	3	C	C	1	A	T	T	3	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant

## Apéndices

TDRHDP E010825	C	C	3	T	T	3	T	T	3	C	C	1	A	Y	Y	2	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concor dant	+	+	+	+	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010046	C	C	3	T	T	3	T	T	3	C	C	1	A	T	T	3	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010269	C	C	3	T	T	3	T	T	3	C	C	1	A	T	T	3	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010324	C	C	3	T	T	3	T	T	3	C	C	1	A	Y	Y	2	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concor dant	+	+	+	+	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010135	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010577	G	G	1	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 3	Weak D Type 3	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010885	C	C	3	T	T	3	T	T	3	C	C	1	A	T	T	3	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010414	C	C	3	T	T	3	T	T	3	C	C	1	A	C	C	1	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concor dant	0	+	0	+	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010148	C	C	3	T	T	3	G	G	1	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 1	Weak D Type 1	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010830	C	C	3	T	T	3	T	T	3	C	C	1	A	C	C	1	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concor dant	0	+	0	+	Concor dant	Concor dant

## Apéndices

TDRHDP E010765	C	C	3	T	T	3	G	G	1	G	G	3	A	Y	Y	2	Weak D Type 1	Weak D Type 1	Concor dant	+	+	+	+	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010333	C	C	3	T	T	3	T	T	3	C	C	1	A	Y	Y	2	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concor dant	+	+	+	+	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010182	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010616	C	C	3	T	T	3	T	T	3	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Weak D Types 1. 2 or 3 not detected (*)	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010915	C	C	3	T	T	3	G	G	1	G	G	3	A	T	T	3	Weak D Type 1	Weak D Type 1	Concor dant	+	0	+	0	Concor dant	Concor dant
TDRHDP E010061	C	C	3	T	T	3	T	T	3	C	C	1	A	Y	Y	2	Weak D Type 2	Weak D Type 2	Concor dant	+	+	+	+	Concor dant	Concor dant

## Difusión de resultados

### Publicaciones

Molano A, Apraiz I, España P, Azkarate M., Vesga MA., Rubia M, Piedrabuena M, Puente F, Veldhuisen B, van der Schoot E, Tejedor D, López M. Performance evaluation study of ID RHD XT, a new genotyping assay for the detection of high-prevalence RhD negative and weak D types. *Vox Sang.* 2018 Oct;113(7):694-700.

### Comunicaciones a congresos

Apraiz I., Pergolizzi S., Franceschetti F., Villa M., Londero D., Stef M., Ochoa G., López M. Performance evaluation study of ID RHD XT as a molecular tool for *RHD* gene screening in pooled blood samples of serologically D<sub>-</sub> C/E+ donors. International Society of Blood Transfusion (ISBT).30th Regional Congress of the ISBT -Basel, Switzerland, June, 2019

Apraiz I., Londero D., Matteocci A., Villa M., Stef M., Ochoa G., López M. ID RHD XT, a sensitive molecular test in pooled DNAs samples. International Society of Blood Transfusion (ISBT).30th Regional Congress of the ISBT -Basel, Switzerland, June, 2019

Apraiz I., Pergolizzi S.S., Franceschetti F., Randi V., Villa M.A., Londero D., Matteocci A., Stef M., Ochoa G., López M. Performance evaluation study of ID RHD XT as a molecular tool for *RHD* gene screening in pooled blood samples of serologically D<sub>-</sub> C/E+ donors. AABB Annual Meeting-San Antonio, TX, US, October, 2019

Apraiz I., Londero D., Matteocci A., Villa A., Stef M., Ochoa G. López M. ID RHD XT, a sensitive molecular test in pooled DNAs samples. AABB Annual Meeting-San Antonio, TX, US, October, 2019

Molano A., Apraiz I., Azcarate M., Vesga M.A., Rubia M., Piedrabuena M., Puente F., Veldhuisen B., Van Der Schoot E., López M. Performance evaluation of ID RHD XT, a genotyping assay for the detection of high prevalence RHD negative and weak D types. International Society of Blood Transfusion (ISBT). 27th Regional Congress of the ISBT - Copenhagen, Denmark, June, 2017

Molano A., Apraiz I., Azcarate M., Vesga M.A., Rubia M., Piedrabuena M., Puente F., Veldhuisen B., Van Der Schoot E., López M. Performance evaluation of ID RHD XT, a genotyping assay for the detection of high prevalence RHD negative and weak D types. AABB Annual Meeting- San Diego, CA, US, October, 2017.

