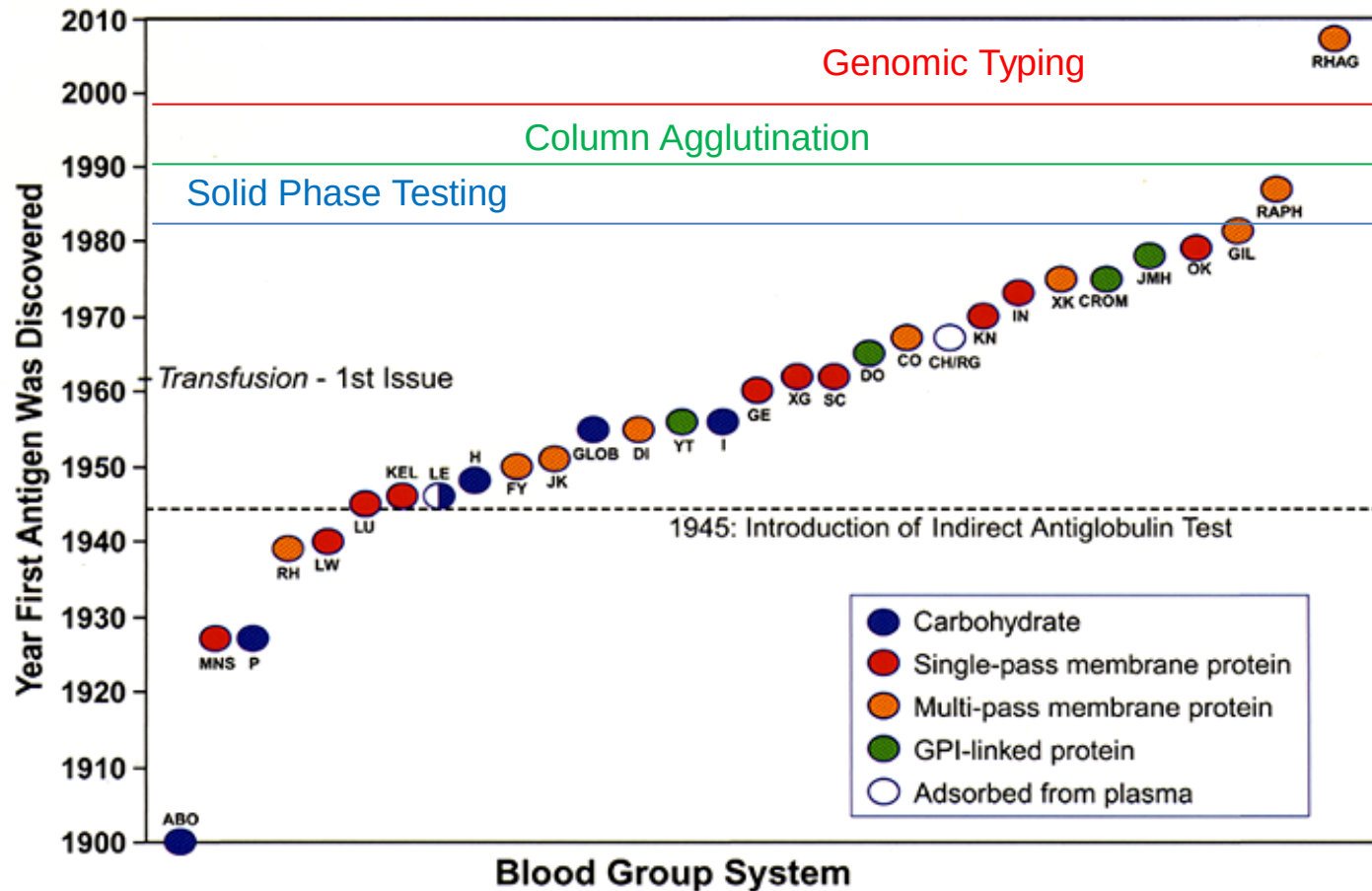


XV CONGRESSO NAZIONALE SIdEM
Torino, 9-12 novembre 2011

**Gestione Appropriata ed Integrata
dei Test Sierologici e Molecolari
nel Laboratorio di
Immunoematologia di II Livello**

Antonella Matteocci
U.O.C. SIMT
Ospedale San Camillo
ROMA

Diagnostica Immunoematologica: Stato dell'Arte



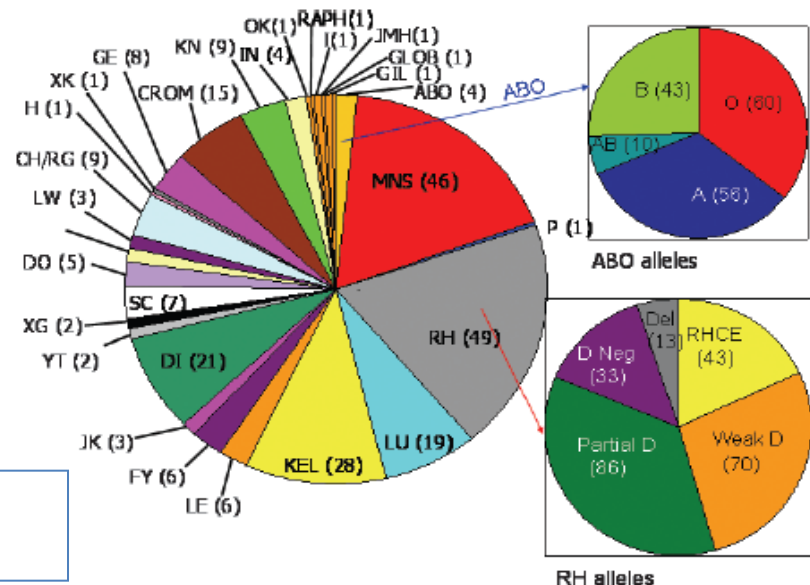
G. Daniels and M. Reid - Transfusion, 2010

Sistemi Gruppo-Ematici

- ❑ 328 antigeni
- ❑ 284 antigeni appartenenti a 30 sistemi (ISBT)
- ❑ 18 antigeni appartenenti a Collezioni (ISBT)
- ❑ 26 antigeni appartenenti a Serie (ISBT)
- ❑ 40 geni
- ❑ 1274 alleli



Blood Group Antigen Gene Mutation Database
(dbRBC) *aggiornato al 18 ottobre 2011*



Difficoltà sierologiche nella tipizzazione eritrocitaria

- ❑ Discrepanze nella tipizzazione AB0
- ❑ Difficoltà nella definizione antigenica in presenza di agglutinazioni a campo misto
- ❑ Discrepanze nella tipizzazione RhD



1. DISCREPANZE TIPIZZAZIONE ABO

- DEBOLE ESPRESSIONE ANTIGENICA
- CAMPO MISTO POST-TRASFUSIONE
- IPOGAMMAGLOBULINEMIA
- FENOTIPO CIS AB
- VARIANTI ABO
- REAGENTI EMODIAGNOSTICI
- CAMPO MISTO POST-TRAPIANTO DI CSE



2. DISCREPANZE TIPIZZAZIONE RhD

- ❑ Campioni negativi con antisieri monoclonali anti-D IgM e/o blend e positivi dopo TAI;
- ❑ Campioni D positivi con alloAc anti-D;
- ❑ Campioni con comportamento sierologico discrepante e/o debole reattività con diversi antisieri.



POLIMORFISMO DEI GRUPPI SANGUIGNI

- Single Nucleotide Polymorphism (SNP)
- Gene Deletion
- Intergenic Recombination
- Inactivating Mutations

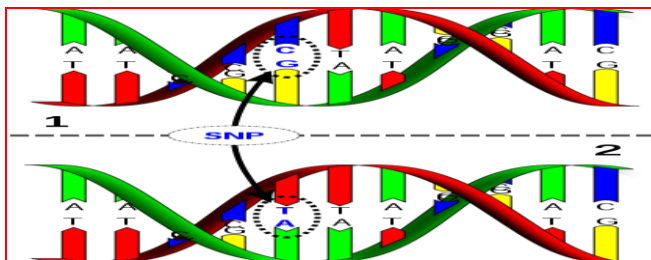


Tabella 1 - SNPs di alcuni antigeni eritrocitari

Sistema gruppoematico	Antigene	SNPs
Rh	C/c	307 C>T
	E/e	676 G>C
	VS	733 C>G
	V	1006 G>T
Kell	K/k	698 T>C
	Kp ^a /Kp ^b	962 G>A
	Js ^a /Js ^b	1910 C>T
Duffy	Fy ^a /Fy ^b	125 G>A
	Fy ^x [Fy(b + *)]	265 C>T
Kidd	Jk ^a /Jk ^b	838 G>A
MNS	M/N	59 C>T
	S/s	143 T>C
Lutheran	Lu ^a /Lu ^b	230 A>G
Dombrock	Do ^a /Do ^b	793 A>G
	Hy + /Hy-	323 G>T
	Jo(a +)/Jo(a -)	350 C>T
Landsteiner-Wiener	LW ^a /LW ^b	308 A>G
Diego	Di ^a /Di ^b	2561 C>T
Colton	Co ^a /Co ^b	134 C>T
Scianna	Sc1/Sc2	169 G>A

G. Daniels, ISBT 2010

Laboratorio Immunoematologia Eritro-Piastrinica - S. Camillo ROMA

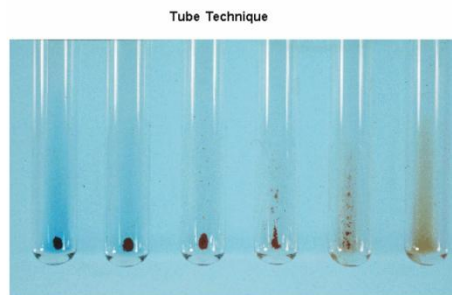
Tecnologie sierologiche in uso



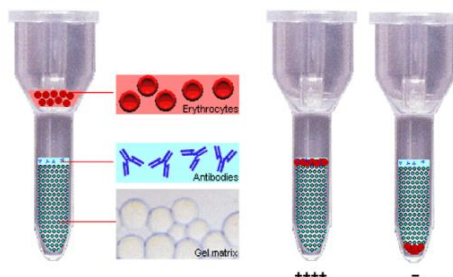
Galileo Immucor



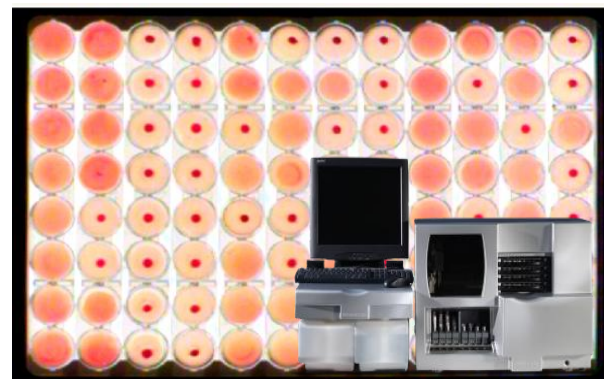
- Tipizzazione ABO/RH/K – Weak-D
- Tipizzazione estesa
- Ricerca anticorpi irregolari
- Ricerca anticorpi anti-piastrine



*Biorad, Formedic,
Menarini, altri*



Ortho Diagnostics, Diamed

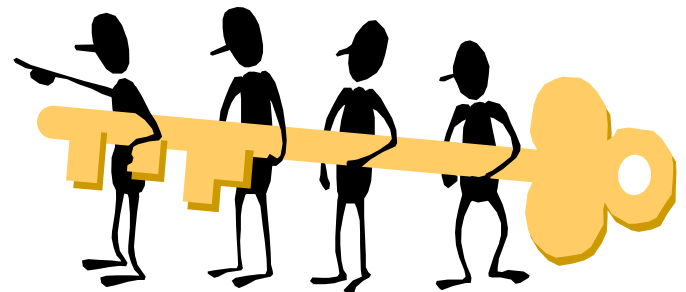


Echo Immucor

Test sierologici di II livello: identificazioni anticorpali, eluati, assorbimenti-eluati, tipizzazione delle varianti RHD, ecc.

Laboratorio Immunoematologia Eritro-Piastrinica - S. Camillo ROMA
LE APPLICAZIONI ATTUALI DELLA BIOLOGIA MOLECOLARE

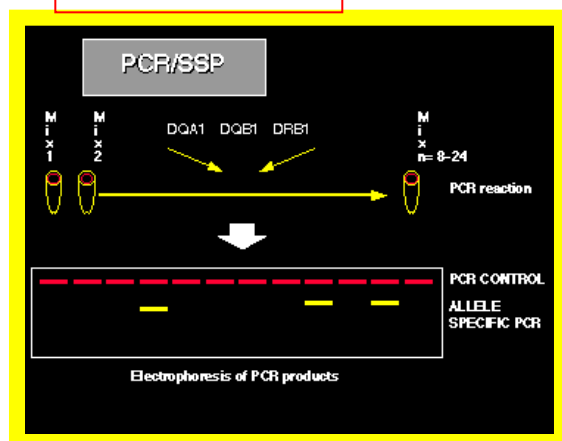
- ☐ Determinazione varianti AB0 e RhD
- ☐ Tipizzazione eritrocitaria e piastrinica dei donatori (Registro)
- ☐ Definizione antigeni in pazienti politrasfusi
- ☐ Conferma fenotipi rari o poco comuni
- ☐ Determinazione RHD-zigosità (feti a rischio di MEN)
- ☐ Pazienti con AIHA
- ☐ Tipizzazione del DNA fetale



Laboratorio Immunoematologia Eritro-Piastrinica - S. Camillo ROMA

Tecnologie molecolari in uso

Dal 2000



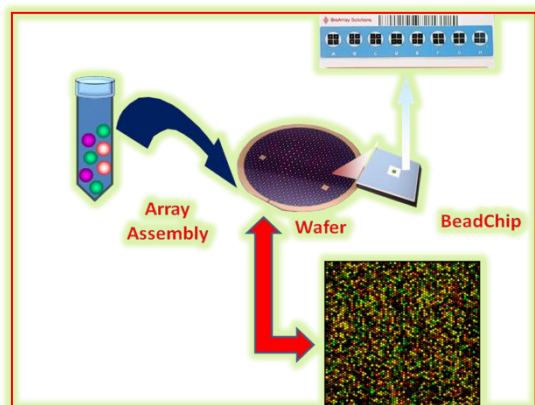
*Singolo
Campione*

*Kit BAG
Formedic*

*Kit InnoTrain
Essemedical*

- Varianti AB0
- Varianti RHD
- Conferma antigeni rari
- Tipizzazione politrasmusi o immunizzati o con TAD +
- RHD Zigosità

Dal 2011



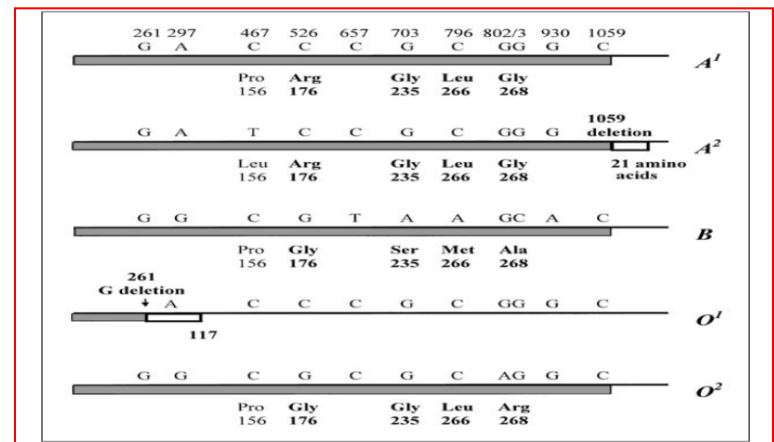
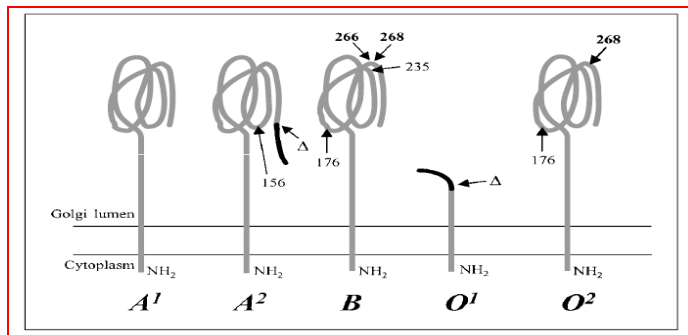
*Elevata
produttività*

*Bioarray
Solution
Immucor*

- Tipizzazione estesa donatori (32 antigeni)
- Tipizzazione politrasmusi/immunizzati
- Tipizzazione piastrinica donatori

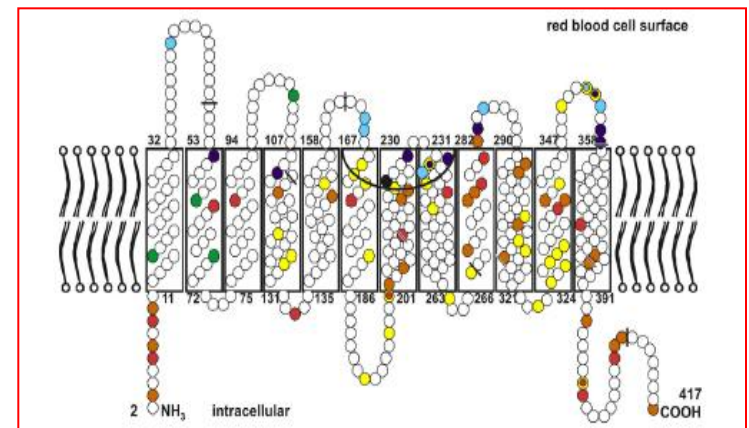
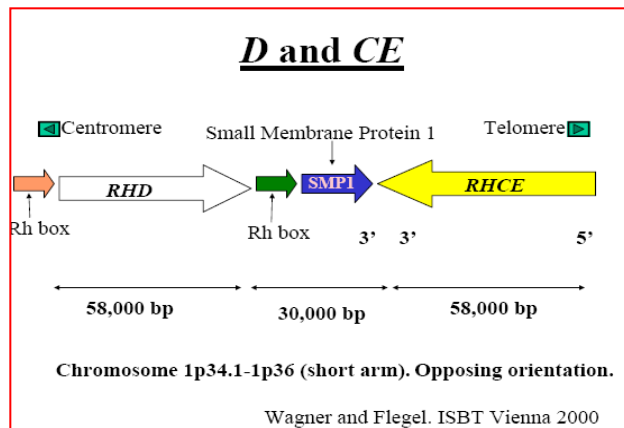
Sistema ABO: Genetica Molecolare

- ❑ 1990 Yamamoto sequenzia il gene della transferasi A (**consensus**) formata da 1.062 nucleotidi e disposta su 7 esoni
- ❑ Geni codificano glicosiltransferasi: N-acetil-galattosil-transferasi (A), galattosil-transferasi (B)
- ❑ mutazioni o delezioni su 6° e 7° esone
- ❑ **allele A2**: su 7° esone sostituzione aminoacidica (prolina-leucina) associata a delezione (nucleotidi 1.059-1.061) con transferasi piu' lunga ma meno attiva di A1
- ❑ **allele 01**: delezione nucleotide 261 sul 6° esone (frame-shift e stop-codon) proteina inattiva
- ❑ **allele 02**: 1 sostituzione (glic-arg)

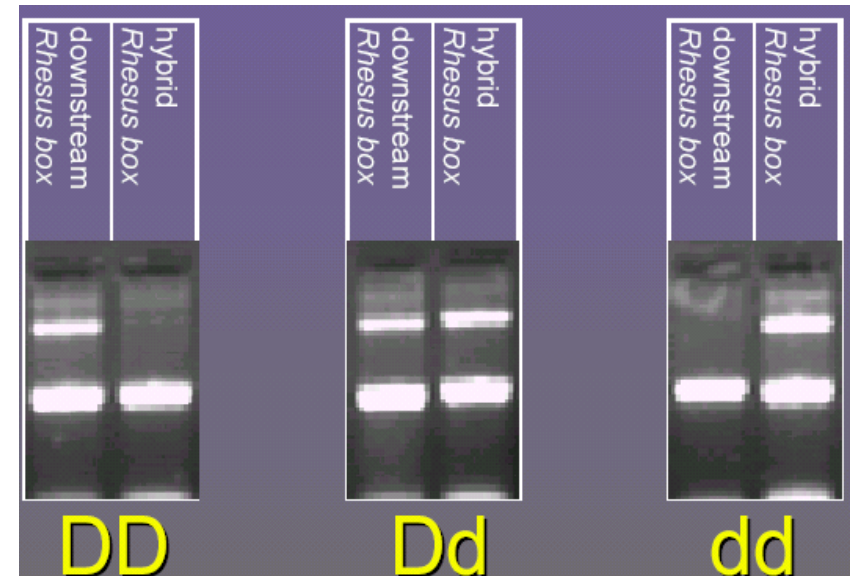
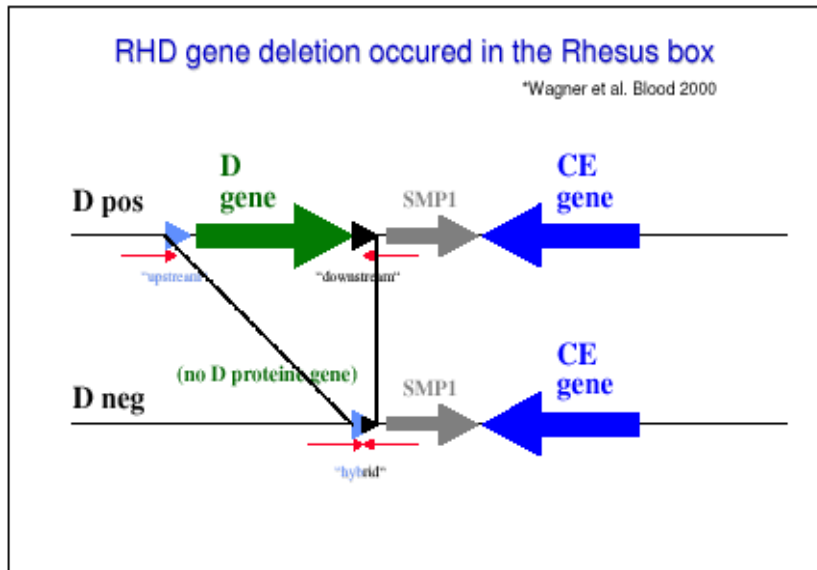


GENI E PROTEINE RH

- ❑ Gli antigeni Rh derivano da due geni con omologia di sequenza, RHD ed RHCE, localizzati sul braccio corto del cromosoma 1 e costituiti da 10 esoni.
- ❑ Il gene RHD codifica per l'antigene D, il gene RHCE per gli antigeni C,c,E,e.
- ❑ Gli antigeni D e quelli della serie CE sono proteine transmembrana di 417 aminoacidi.
- ❑ Varianti: D-weak, D-partial, DEL



STUDIO DELLA D-ZIGOSITA'



omozigote

eterozigote

D-negativo

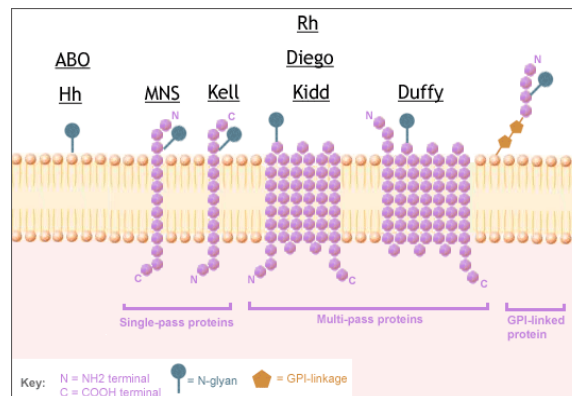
La D-zigosit  viene determinata in base a:

- Positiv  del Downstream Rhesus Box (**DD**)
- Positiv  del Hybrid Box Rhesus Box (**dd**)
- Positiv  del Hybrid e Downstream Rhesus Box (**Dd**)



GENETICA MOLECOLARE DEI SISTEMI KELL, DUFFY, KIDD

- **Kell:** cromosoma 7 - 19 esoni (polimorfismo dei 20 antigeni dal 4° al 19° esone, K/k su 6° esone)
- **Duffy:** SNPs per Fy(a), Fy(b), Fy(x)(b weak); Fy(a-b-), Fy(b) silente, nelle popolazioni africane sostituzione nel promoter (GATA) specifico per gli eritrociti.
- **Kidd:** 11 esoni - i due antigeni sono il prodotto di due alleli per singola sostituzione sul 9° esone



TEST ESEGUITI NEGLI ULTIMI 5 ANNI
(anni 2006-2011)

➤ *Tipizzazioni sierologiche: N.105.000*

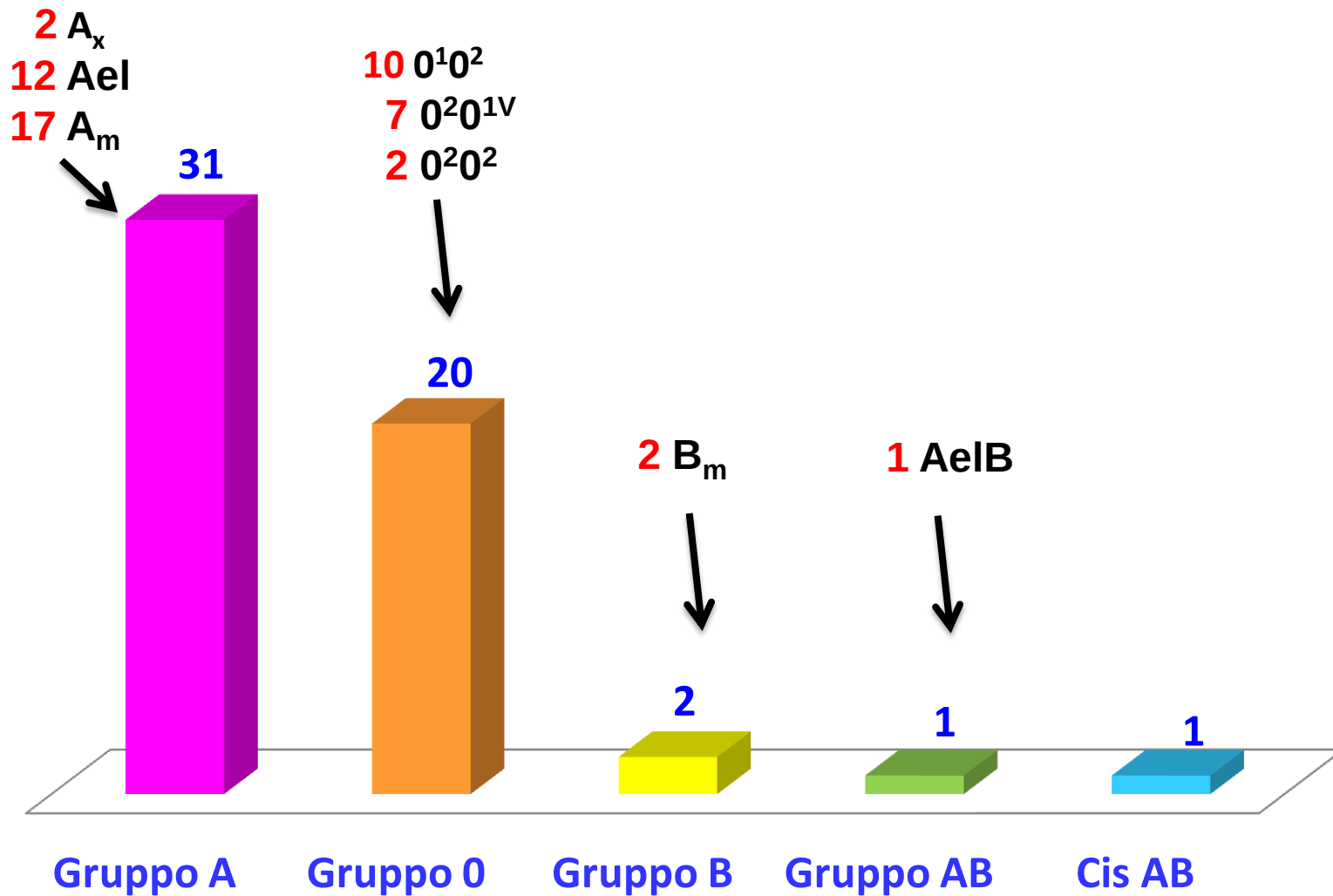
➤ *Tipizzazioni molecolari:*

- ❑ Tipizzazioni molecolari sistema ABO: N. 120
- ❑ Tipizzazioni varianti ABO: N. 55
- ❑ Tipizzazioni per alleli RHD: N. 1.650
- ❑ Tipizzazioni RH o estese politrasfusi/trapiantati/immunizzati: N.155
- ❑ Tipizzazioni Estese Donatori: N. 245 (nel 2011)



Risultati

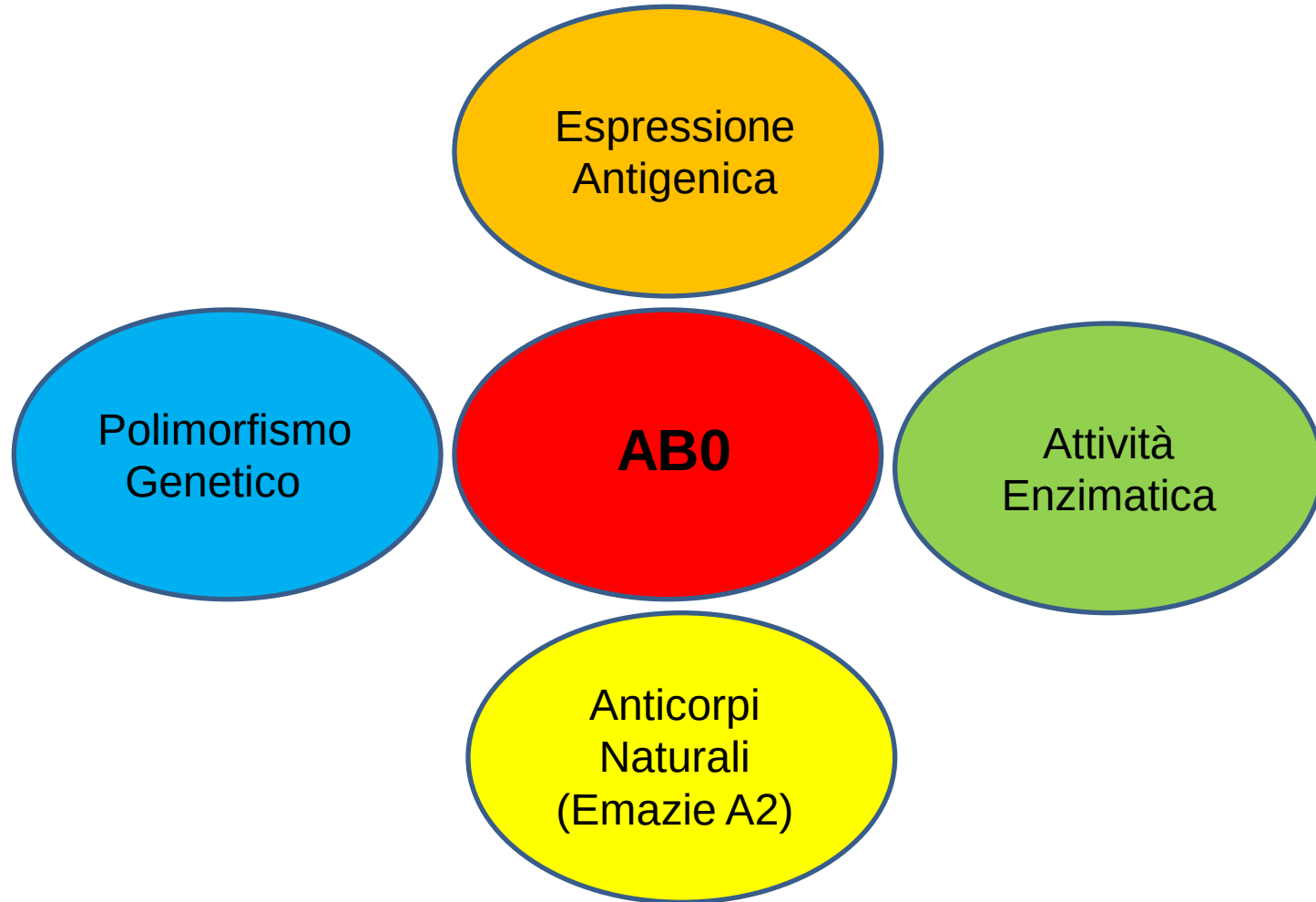
Tipizzazione Varianti AB0: N° 55



INDAGINI MOLECOLARI E VARIANTI

***Circa il 50% dei test
molecolari NON sono
conclusivi per le varianti di
GRUPPO A e B***

La complessità del Sistema AB0



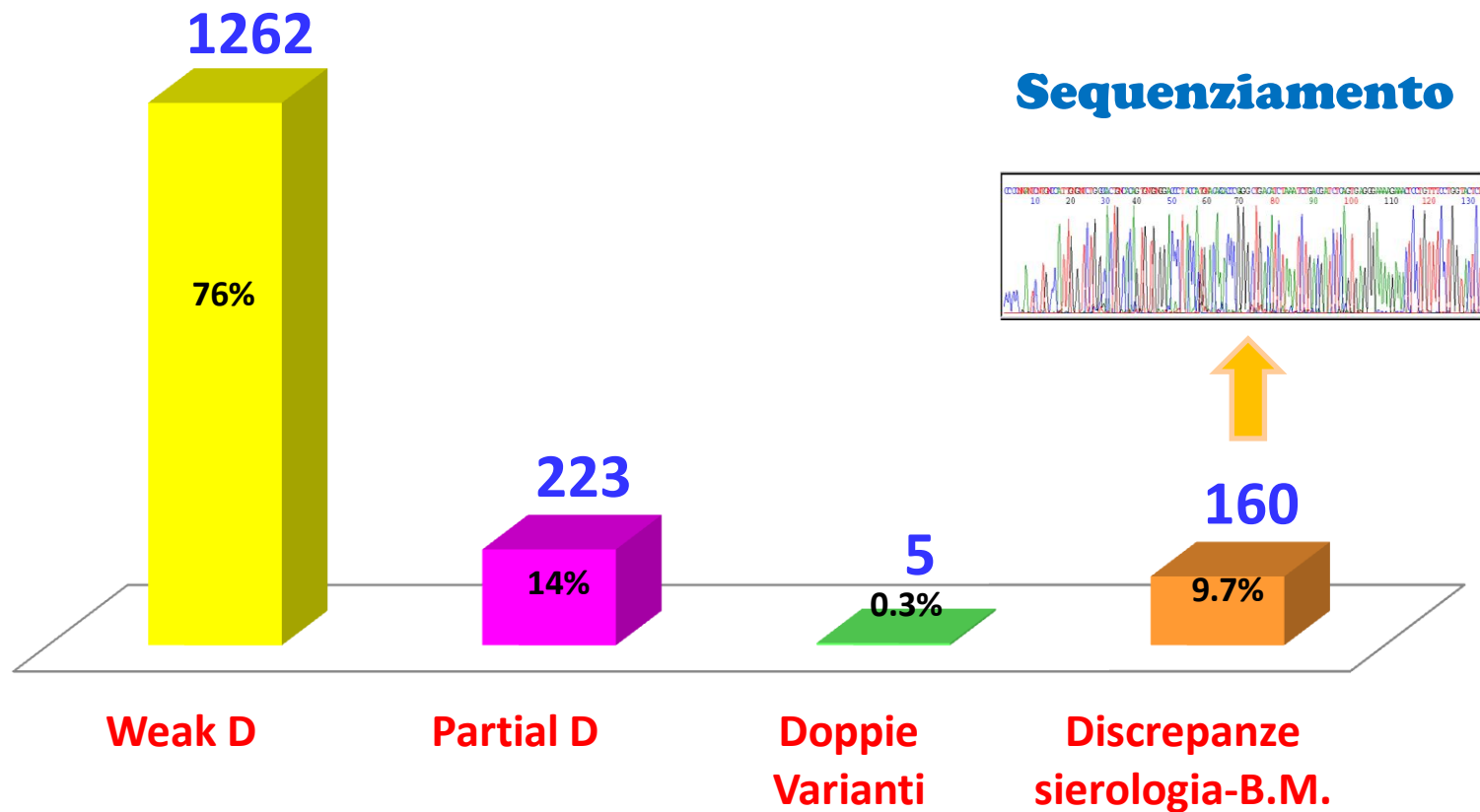
LE CARATTERISTICHE SIEROLOGICHE DELLE VARIANTI

Sub-group of A	Reactions* with				Substances in saliva†	Anti-A1 in serum
	Anti-A	Anti-A,B	Anti-A1	Anti-H		
A ₁	++++	++++	++++	0	A, H	No
A ₂	++++	++++	0	++++	A, H	Sometimes
A _{int}	++++	++++	++(+)	+++	A, H	No
A ₃	++(+) ^{mf}	++(+) ^{mf}	0	++++	A, H	Sometimes
A _x	0/+	++(+)	0	++++	H	Often
A _{and}	+	+	0	++++	H	Sometimes
A _m	0/+	0/+	0	++++	A, H	No
A _{finn}	+	+	0	++++	H	Yes
A _{bantu}	+(+)	+(+)	0	++++	H	Yes
A _{12a}	0 [‡]	0	+++**	++++	H	Yes***
A _y	0 [‡]	0	0	++++	A, H	No
A _{el}	0 [‡]	0	0	++++	H	Sometimes

Immunohematology 2009

Risultati

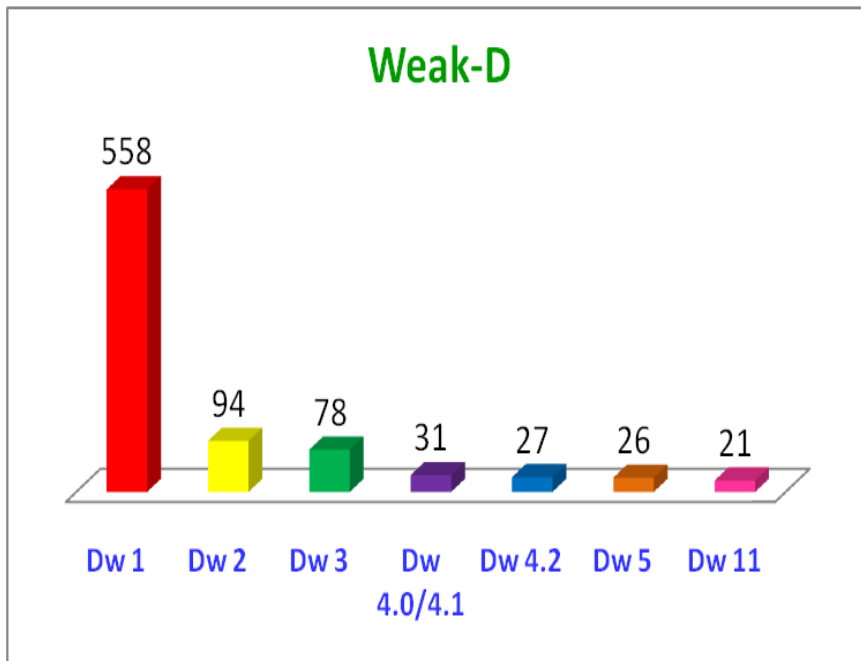
Varianti RhD: N. 1650



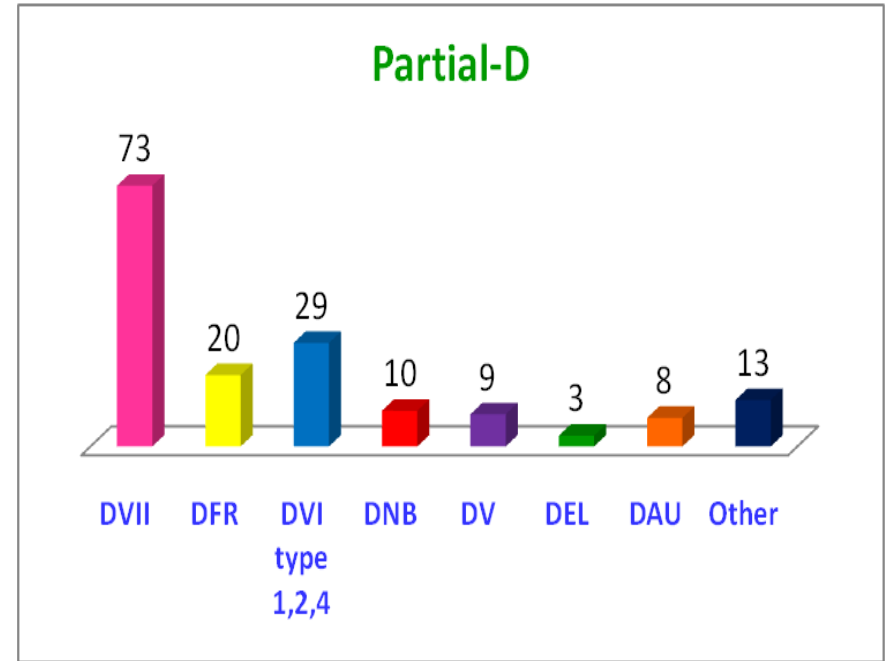
www.progetto-arcobaleno.it

Totale varianti al 30/06/2011: N. 1.000

Totale Weak D: 835



Totale Partial D: 165



TIPIZZAZIONE VARIANTI RHD

Studio Sierologico:

	1°→D Blended	2°→D Blended	3° →D Blended	→D/ IgG	→D/ IgM
IS	-	-	-	-	-
37°	-	-	-	-	-
TCI	-	-	-	-	
Vetrino	-	-	-	-	-
Vetrino →CDE	+		Fenotipo	Ccee	
TCD	neg				

Studio Sierologico:

	1°→D Blended	2°→D Blended	3° →D Blended	→D/ IgG	→D/ IgM
IS	+	+	+	+/-	-
37°	+	++	+	+/-	+/-
TCI	+/-	+++	++	++	
Vetrino	+	+	+	+	+
Vetrino →CDE	+		Fenotipo	Ccee	
TCD	neg				

Studio Molecolare:

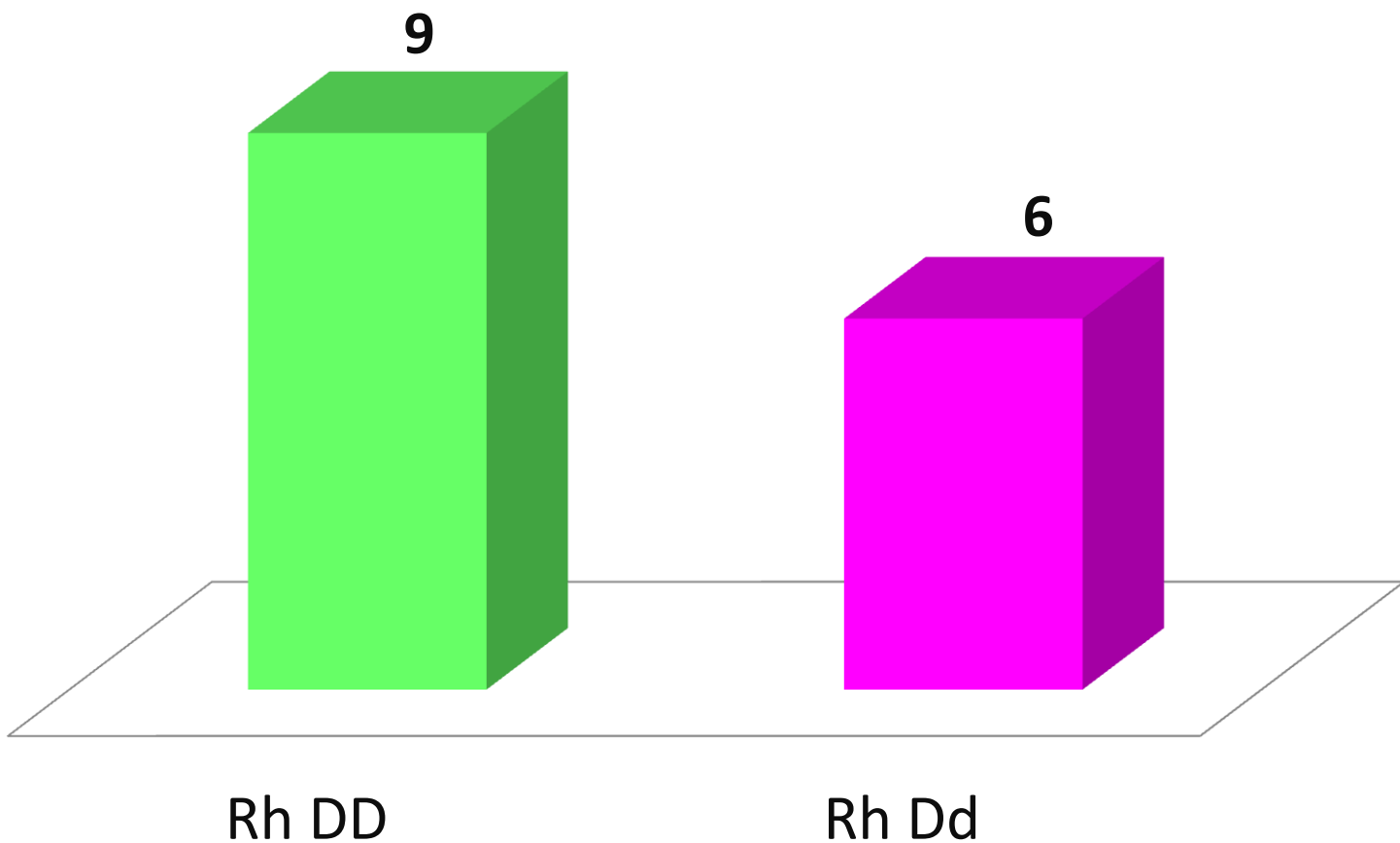
Weak D tipo 11

Studio Molecolare:

DNB

Risultati

RHD Zigosità: N.15



Tipizzazione eritrocitaria in B.M.

In 155 pazienti immunizzati o politrasfusi

- ☐ **Pazienti Emoglobinopatici**
- ☐ **Pazienti Onco-ematologici**
- ☐ **Pazienti con AHIA**
- ☐ **Pazienti candidati a trapianto di CSE**
- ☐ **Pazienti immunizzati**

...Risultati

- | | |
|---|---------------------------------------|
| ☐ 10 Fy (a- b-) | ☐ 5 Yta (-) |
| ☐ 4 Fy (a- b _{weak}) | ☐ 2 Co (a- b-) |

Limiti delle Tecniche Sierologiche

- ❑ Presenza di campi misti nei politrasmfusi o trapiantati
- ❑ Difficoltà nella tipizzazione in pazienti con TAD +
- ❑ Alcuni sieri sono rari e costosi
- ❑ Difficoltà nella tipizzazione RhD



LIMITI DELLE TECNICHE SIEROLOGICHE NELLA TIPIZZAZIONE RhD

Utilizzo di due antisieri anti-D di cloni diversi

■ PAZIENTI: Tipizzazione RhD

Le varianti DVII, DNB and weak-D type 3 vengono spesso classificate come RhD Positivi (rischio di immunizzazione) per l'elevata densità antigenica sulla membrana

■ DONATORI: Test per il Weak-D (IAT) su RhD Negativi

Le varianti weak-D type 11 and DEL vengono spesso classificate come RhD Negativi (rischio alloimmunizzazione) per la densità antigenica molto bassa



Limiti della Biologia Molecolare

- ❑ Gene non ancora scoperto
- ❑ Meccanismo molecolare complesso
- ❑ Mancanza varianti specifiche (alleli) gruppi etnici



IL GENOTIPO NON E' UN FENOTIPO

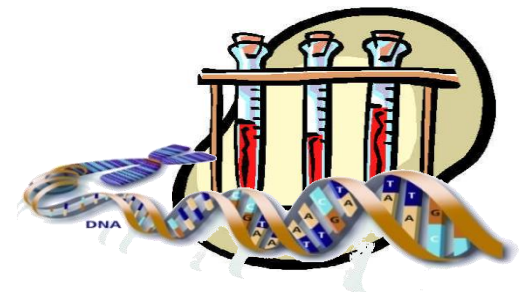
CONCLUSIONI -1

Criticità riscontrate

- La tipizzazione molecolare non è stata conclusiva nel 50% degli alleli AB0 e nel 10% degli alleli RHD
- E' risultata una concordanza del 99,6% tra sierologia e molecolare per gli altri sistemi in quanto la sierologia non ha evidenziato due Fy b_{weak}

Quale tecnologia utilizzare?

- Metodiche sierologiche per la tipizzazione AB0 (valutazione score di reazione)
- Metodiche sierologiche e molecolari per le varianti RHD
- Metodiche sierologiche e molecolari per la tipizzazione estesa
- Metodiche molecolari per la conferma di antigeni rari/dubbi
- Metodiche molecolari per la RHD zigosità



CONCLUSIONI -2

- Valorizzazione diagnostica delle tecnologie
- Integrazione appropriata delle tecnologie (algoritmi diagnostici)
- Revisionare caratteristiche tecniche degli antisieri
- Ampliare i kit con nuovi alleli
- Implementare tecniche di sequenziamento





Immunoematologia Molecolare

Applicazioni Future

- “Dry” Genotype-Matched for Red Cell Transfusions (extended antigen matching) (*E. Klapper, AABB 2011*)

Antigen matching stringency levels

Level	Antigen Set	Antigen Number
1	AB(O), D PLUS: (“Ag-neg”)	3 + #Ag-neg
2	Level 1 PLUS: c, C, e, E, K	+ 5
3	Level 2 PLUS: Fy ^a , Fy ^b , Jk ^a , Jk ^b , S, s	+ 6
4	Level 3 PLUS: k, M, N; Do ^a , Do ^b , Hv, Jo ^a , Lu ^a , Lu ^b	+ 9

Antigen Spectrum

AB(O), D, (Ab), c, C, e, E, K, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S, s, Lu^a, Lu^b, M, N, Do^a, Do^b, Hv, Jo^a, k

Level 1 Level 2 Level 3 Level 4

Klapper et al *TRANSFUSION*, Volume 50, March 2010

- Fetal RhD Detection from Maternal Plasma (*G. Daniels, ISBT 2011*)



Gruppo Progetto Arcobaleno

A. Moscetti
C. Spaccino
A. Collaretti
K. Castagna
L. Rogai

L. Damiani
E. Mannella
P. Grammatico
L. Pierelli

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

