FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO
Sistema Sanitario Regione Lombardia

Integrazione di metodiche sierologiche e molecolari per la tipizzazione del donatore e del ricevente

Dott. ssa M. Antonietta Villa

Centro Trasfusionale e di Immunoematologia
Dipartimento di Medicina Rigenerativa
Fondazione IRCCS Ca' Granda
Ospedale Maggiore Policlinico – Milano

XV Congresso Nazionale della SIDEM, Torino 10 novembre 2011

Antigeni eritrocitari

- Ad oggi sono stati scoperti e classificati dall' ISBT più di 300 antigeni eritrocitari

- 270 appartengono ad uno dei 30 sistemi eritrocitari

- I rimanenti sono raggruppati in collections o series

Sistemi antigenici

Numero	Simbolo sistema
001	ABO
002	MNS
003	P1PK
004	RH
005	LU
006	KEL
007	LE
008	FY
009	JK
010	DI
011	YT
012	XG
013	SC
014	DO
015	CO

Numero	Simbolo sistema
016	LW
017	CH/RG
018	H
019	XK
020	GE
021	CROM
022	KN
023	IN
024	OK
025	RAPH
026	JMH
027	I
028	GLOB
029	GIL
030	RHAG

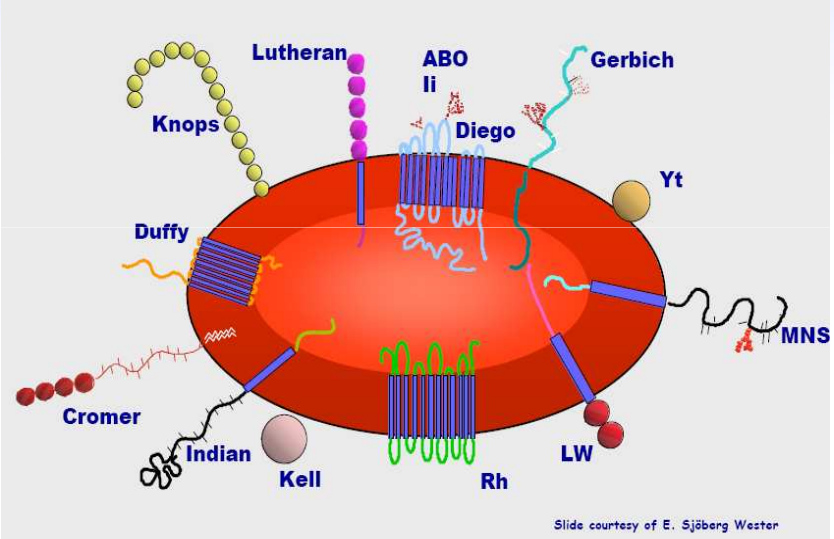
ISBT (International Society of Blood Transfusion) Working Party on Terminology for Red Cell Surface Antigens
http://ibgrl.blood.co.uk/isbt

Collections e Serie

Collezioni di antigeni (Collections)	Cost, I, ER, GLOB, Vel, Unnamed,
Serie 700 (antigeni a bassa incidenza)	By, Chr^a, Bi, Bx^a, To^a, Pt^a, Re^a, Je^a, Li^a, Milne, RASM, JFV, Kg, JONES, HJK, HOFM, SARA, REIT
Serie 901 (antigeni ad alta incidenza)	Lan, At^a, Jr^a, Emm, AnWj, Sd^a, PEL, MAM

ISBT (International Society of Blood Transfusion) Working Party on Terminology for Red Cell Surface Antigens
http://ibgrl.blood.co.uk/isbt

Cosa sono gli antigeni eritrocitari

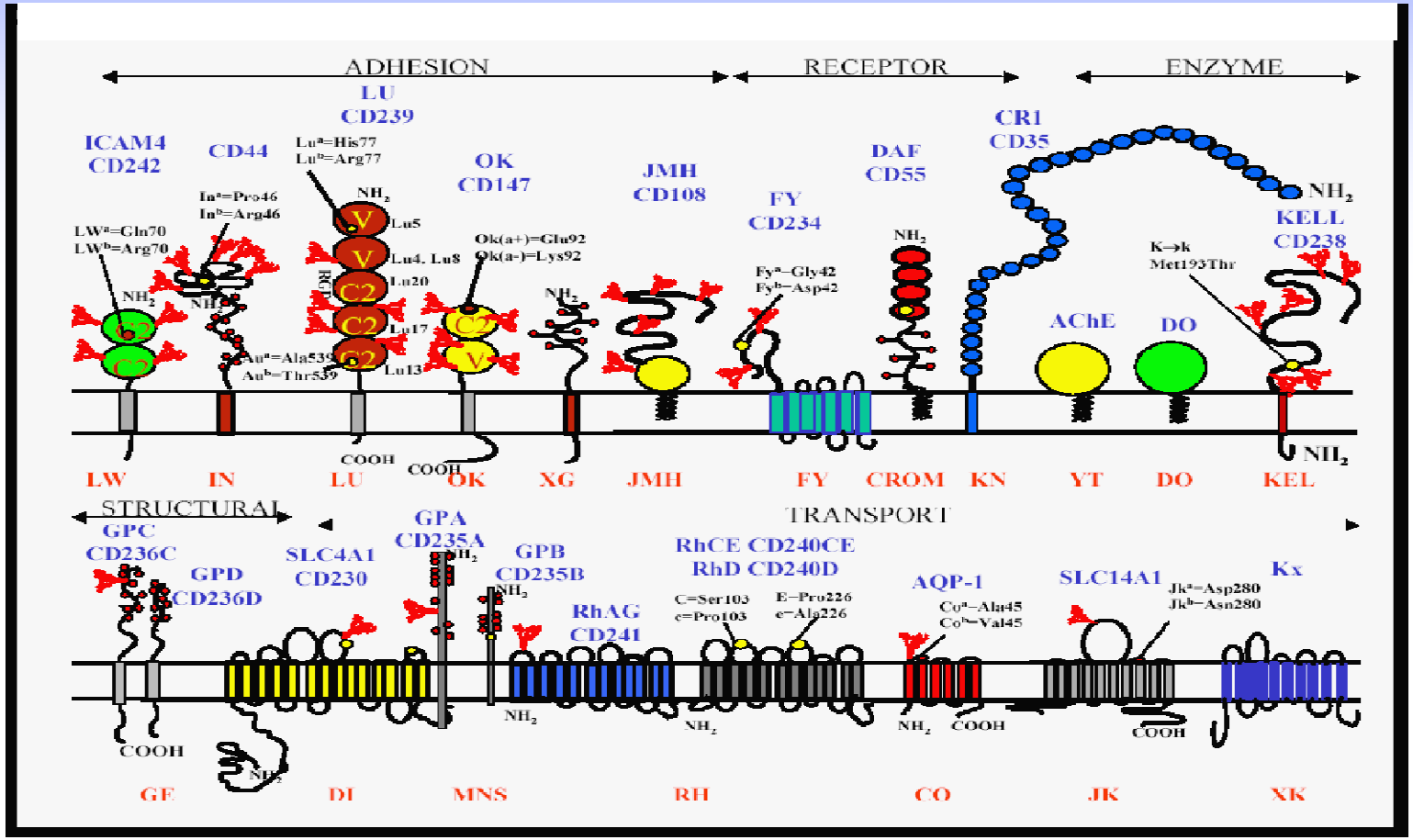


- Proteine polimorfiche riconosciute come sostanze estranee dal sistema immunitario

- Molecole di zuccheri terminali riconosciute da anticorpi specifici

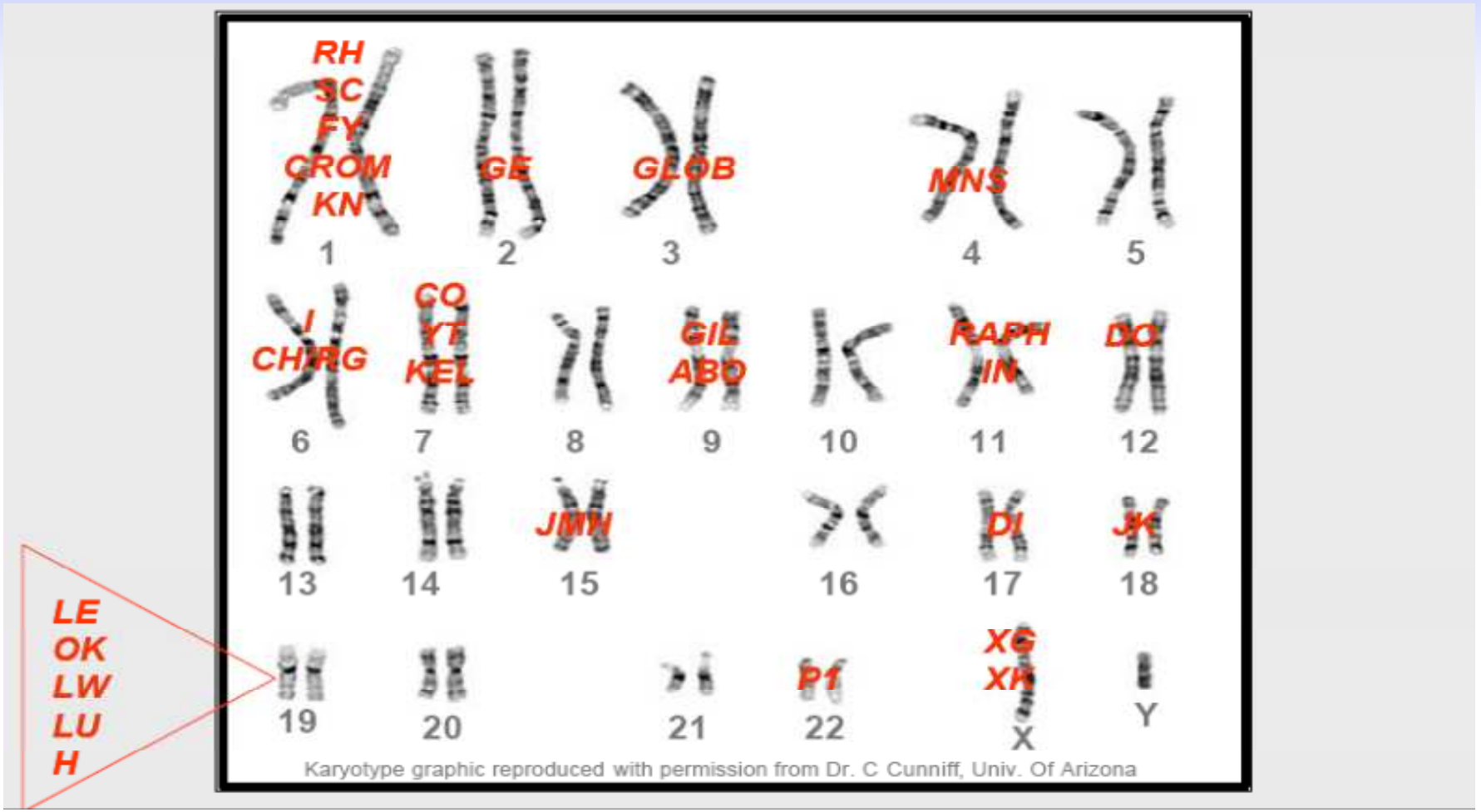
FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO
Sistema Sanitario Regione Lombardia

Gli antigeni eritrocitari: funzioni

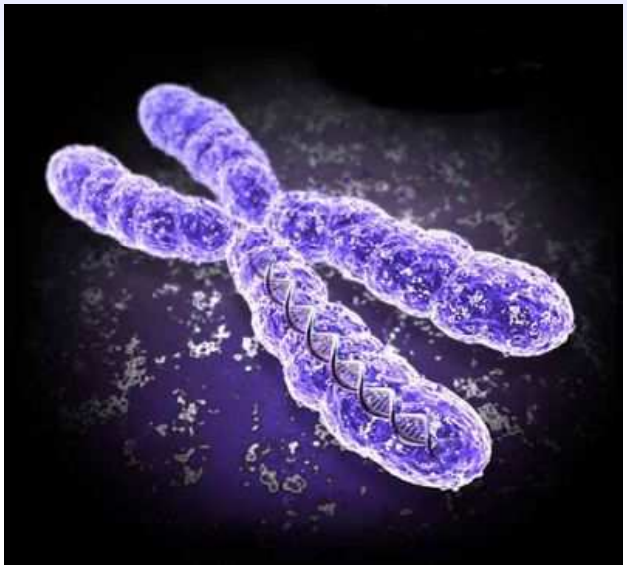


Gli antigeni eritrocitari

Gli antigeni dei gruppi sanguigni sono ereditati



Gli antigeni eritrocitari



- Antigeni proteici: prodotto primario di un gene

  Es. RH, KEL, FY

- Antigeni carboidratici: sotto il controllo di un gene che codifica una glicosiltransferasi

  Es. AB0, P, Lewis, H, I, Globside

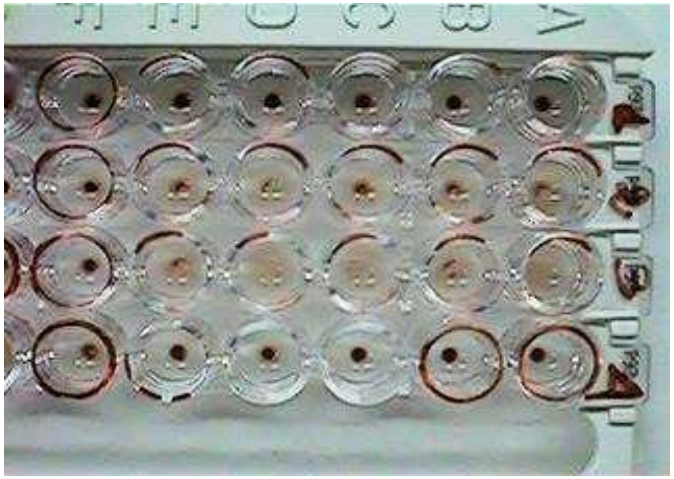
Agglutinazione

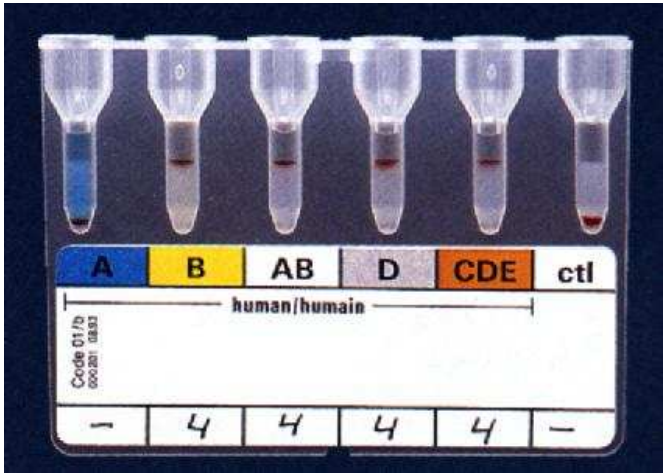
- Il metodo classico per la tipizzazione eritrocitaria del donatore e del ricevente è l'agglutinazione

- Questa tecnica è stata utilizzata per decenni in immunoematologia

Agglutinazione

- Semplice
- Poco costosa
- Specifica e sensibile



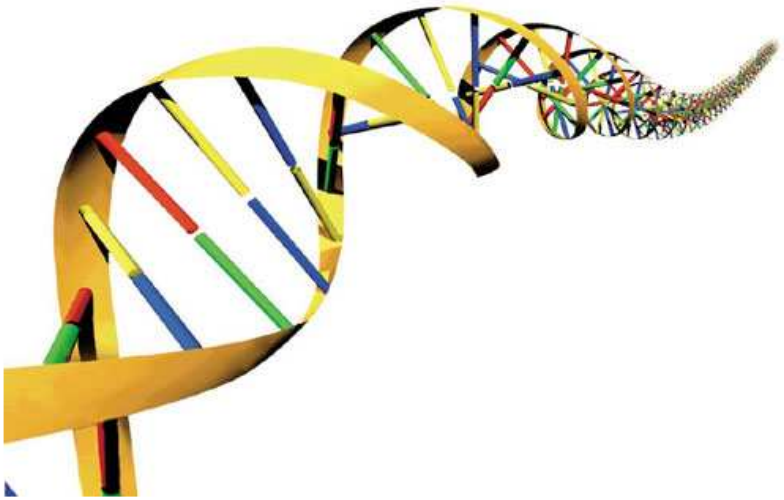


Limiti

- Disponibilità di alcuni antisieri commerciali
- Costo degli antisieri
- Test soggettivo
- Non e' in grado di fornire un'indicazione certa del rischio di malattia emolitica del neonato o del feto
- Non si può essere utilizzare per tipizzare un paziente recentemente trasfuso
- Può essere difficile tipizzare un paziente con autoanticorpi
- Non è in grado di determinare la zigosità
- Non è in grado di determinare i fenotipi *weak*

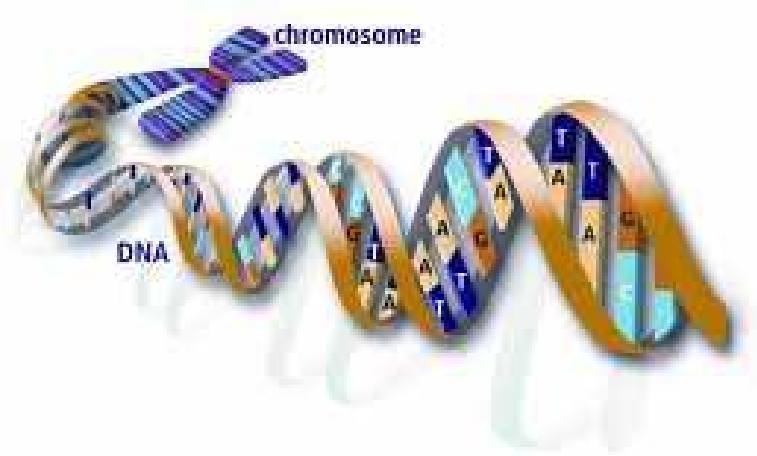
Gli antigeni eritrocitari

- Le basi molecolari di quasi tutti i gruppi sanguigni sono state definite
- Partendo da test su DNA genomico è possibile predire i fenotipi dei principali gruppi sanguigni



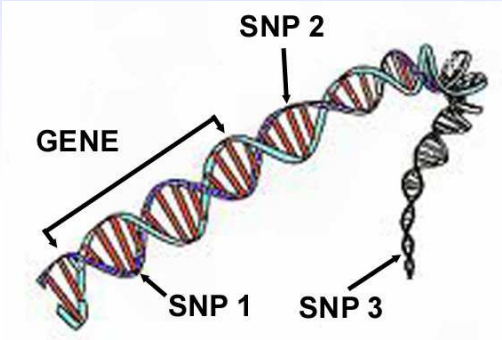
Gli antigeni eritrocitari

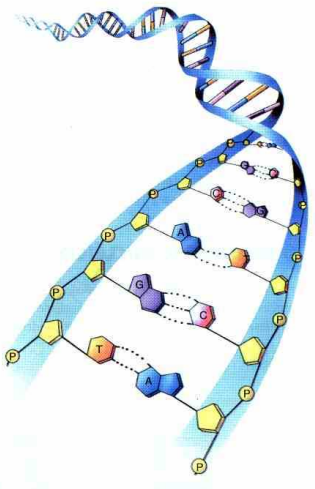
Le diversità sierologiche degli antigeni e dei fenotipi eritrocitari possono essere spiegate a livello genico da differenti meccanismi



FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO
Sistema Sanitario Regione Lombardia

Meccanismi genetici che generano la diversità degli antigeni eritrocitari



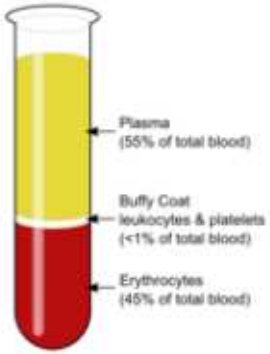


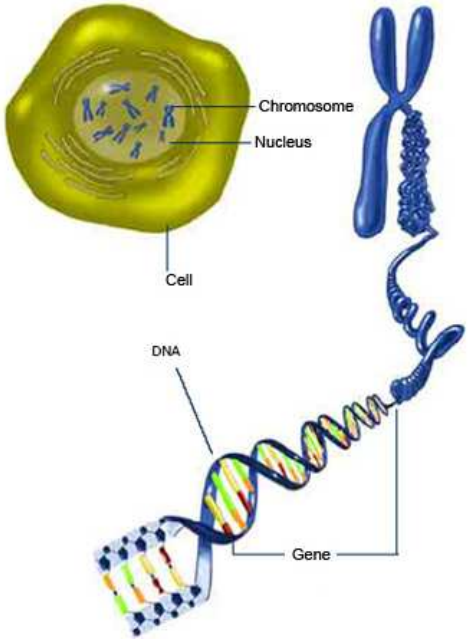
- Polimorfismo di un singolo nucleotide (SNP)
  Es. La maggior parte degli antigeni
- Delezione di un gene, esone o nucleotide
  Es. AB0, MNS, RH, KEL, DY,DO, GE
- Inserzione di uno o più nucleotidi
  Es. RH , CO
- Duplicazione di un esone, più esoni o intero gene
  Es. GE
- Conversione del gene o ricombinazione
  Es. MNS, Rh,CH/RG

DNA genomico

Si può ottenere da diverse fonti:

- Sangue intero (buffy coat)
- Saliva (cellule epiteliali)
- Urine (cellule epiteliali presenti nel sedimento)
- Liquido amniotico o villi coriali
- Plasma materno





Per l'estrazione si possono utilizzare:

- Metodi manuali (fenolo/cloroformio, salting-out, colonne di silice)
- Metodi automatici (colonne o biglie magnetiche)

Tecniche molecolari

- PCR-RFLP
- PCR-SSP e PCR-RT:
  - ✓ Kit commerciali
  - ✓ Home made
- PCR-SBT
- GENE ARRAY o LUMINEX™ basati piattaforme:
  - ✓ Gen-Probe : LIFECODES®RBC, LIFECODES®RBC-R
  - ✓ Immucor: BioArray™ HEA Beadchip
  - ✓ Progenika :Bloodchip^{ID} reference , Bloodchip^{ID}core, Bloodchip^{ID}core+

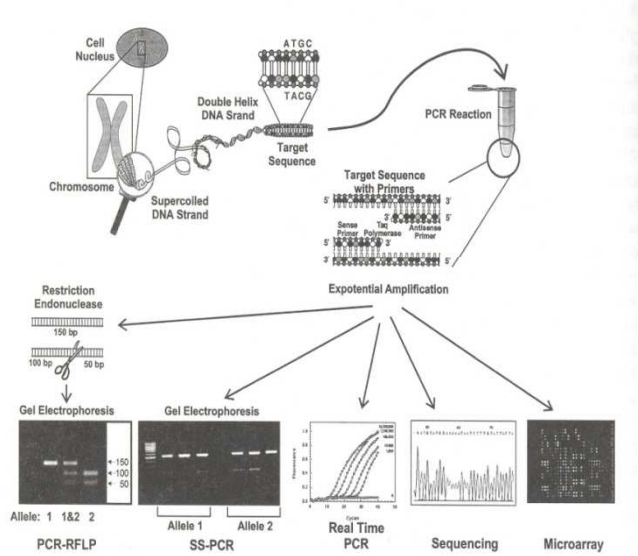


Figure 4-1. Schematic representation of techniques that may be used to identify blood group alleles and methods for visualization. (Graphic DNA microarray courtesy of James C. Liao, PhD, UCLA.)

Tecniche molecolari

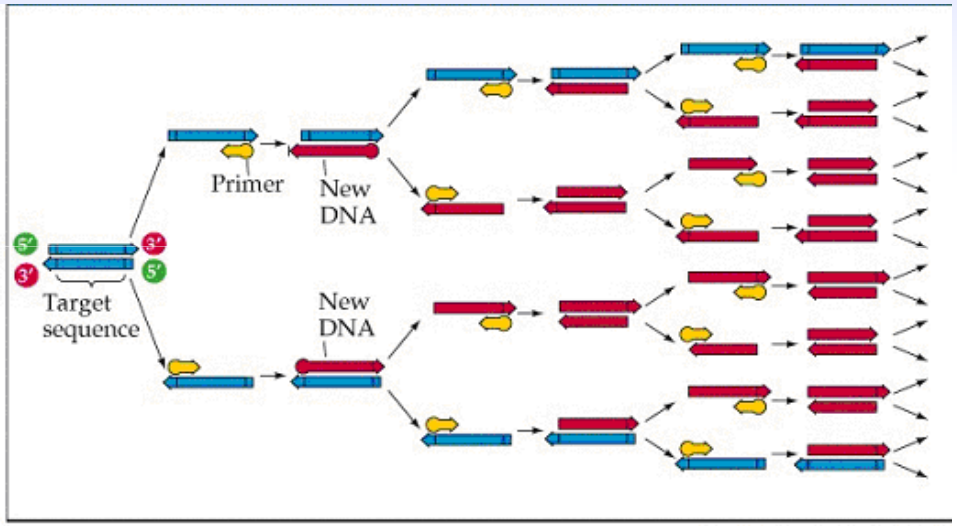
Bassa produttività come:

- PCR-RFLP
- PCR-SSP
- PCR-SBT

Alta produttività come:

- PCR-real-time
- MicroArray

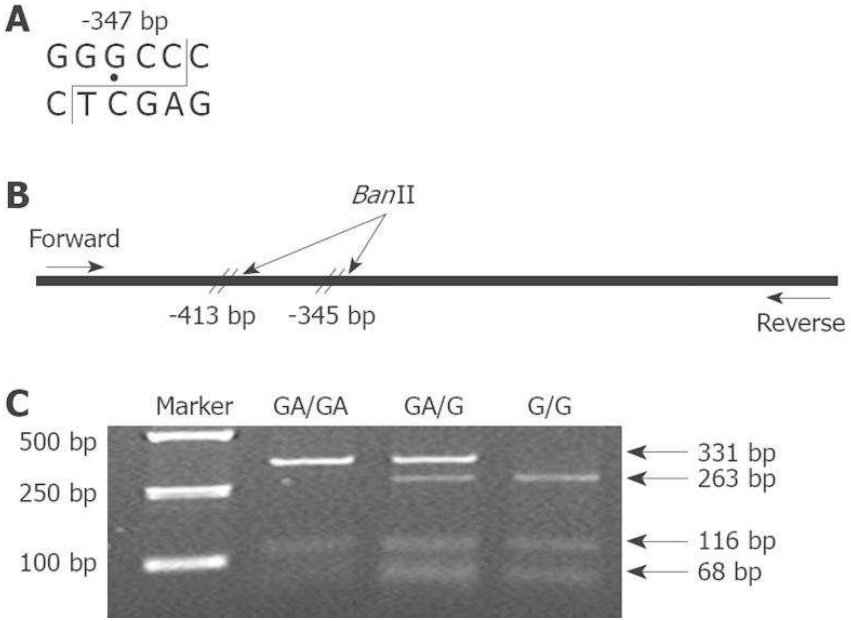
Polymerase Chain Reaction



- La PCR è il punto di partenza della maggior parte delle analisi molecolari
- Amplifica una specifica regione di DNA
- Milioni di copie di prodotti di DNA sono prodotti in poche ore

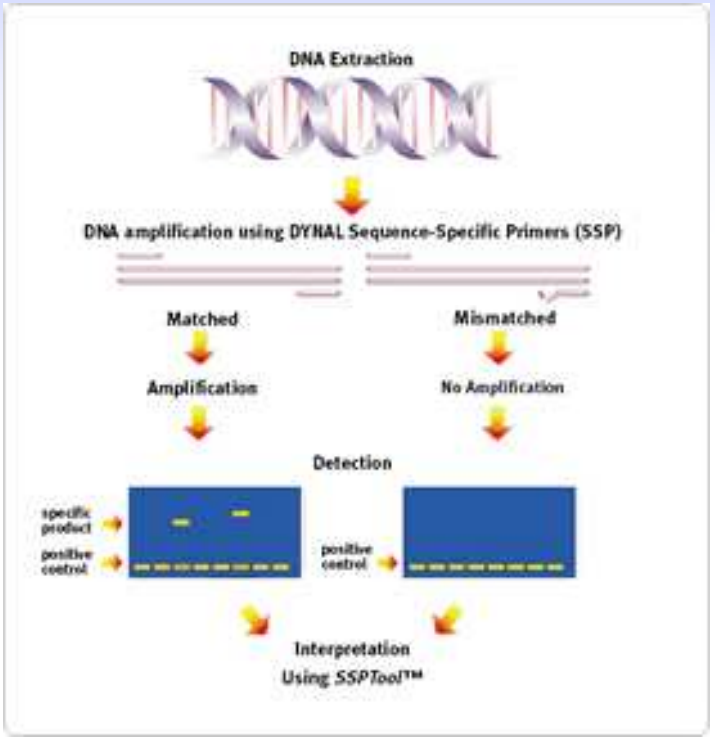
PCR- RFLP

- La sigla RFLP è l'acronimo di *Rescrition Fragment Length Polymorphismn*
- Il prodotto della PCR viene digerito con enzimi di restrizione
- I fragmenti di DNA sono separati da gel di elettroforesi
- La visualizzazione con UV permette l'interpretazione nello stesso giorno



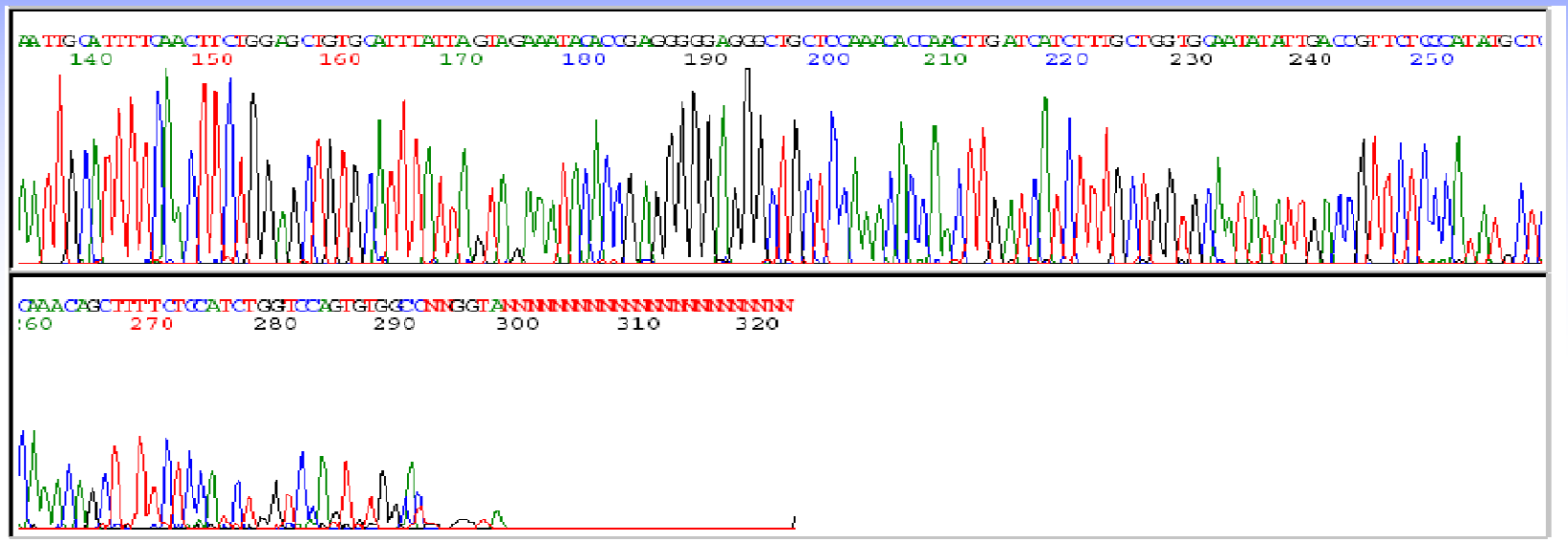
PCR-SSP

- La sigla SSP è l'acronimo di *Sequence Specific Primer*
- Si basa sull'utilizzo di primer specifici per riconoscere lo SNPs d' interesse
- Kit commerciali attualmente disponibili possono rilevare antigeni comuni (ABO, varianti ABO, Rh, weak D, Partial D, D zigosità, KEL, JK, FY, MNS) ed antigeni rari (LU, DI, DO, CO, YT, KP, KN)



FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO
Sistema Sanitario Regione Lombardia

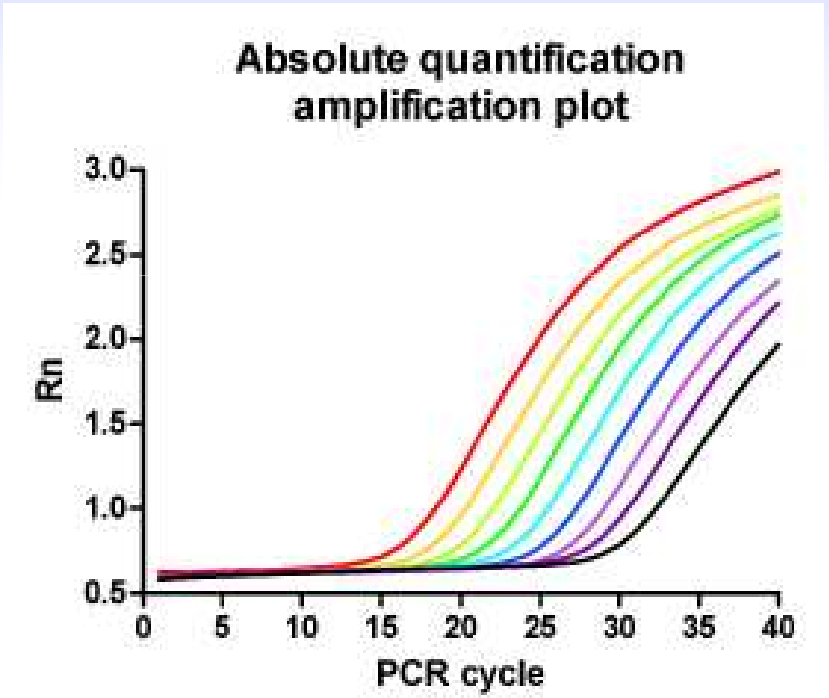
Sequencing based typing SBT



- Permette di ottenere la sequenza nucleotidica di un gene o di una sua parte
- Il metodo più utilizzato è quello enzimatico basato sulla sintesi di una catena di DNA complementare a quella in esame, usando dideossinucleotidi (ddNTPs) marcati con un composto fluorescente di colore diverso per ogni base
- Dopo un elettroforesi capillare la sequenza nucleotidica viene comparata con una sequenza 'consensus' per identificare le differenze

PCR Real-Time

- Misura il prodotto della PCR in tempo reale misurando la fluorescenza emessa dai coloranti intercalanti (SBYR green) o dalle sonde marcate (TaqMan, Molecular Beacon)
- La fluorescenza emessa è direttamente proporzionale alla quantità di prodotto amplificato
- Migliora l' interpretazione dei risultati con una quantificazione più affidabile mediante una lettura dei dati automatica

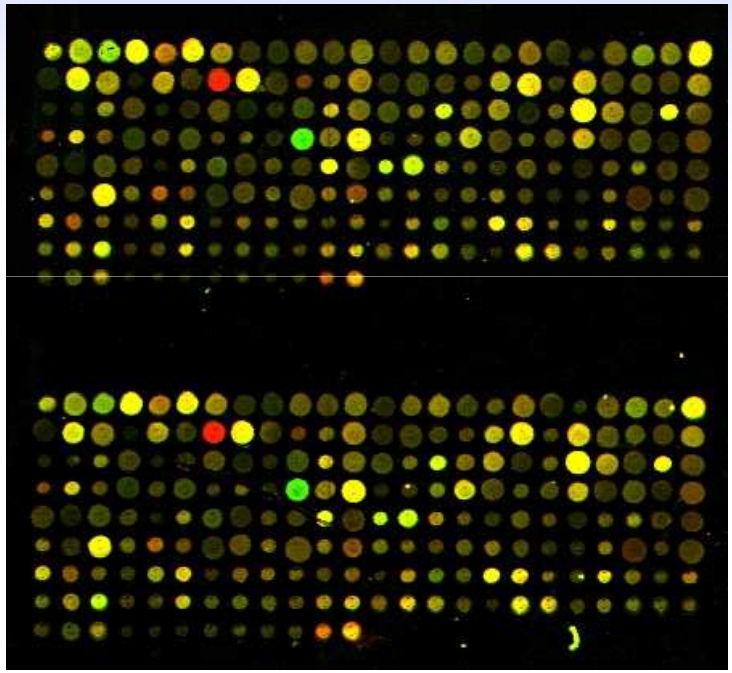


Microarray

- Permette l'analisi simultanea di migliaia di geni o di un ampio numero di polimorfismi genetici

- Gli array a DNA possono essere fabbricati usando cDNA amplificato (usati per l' analisi dell' espressione genica) o oligonucleotidi (50-120 pb) utilizzati per lo studio degli SNPs

- La presenza di un polimorfismo è dato dalla presenza/assenza del segnale fluorescente in corrispondenza della sonda specifica



Microarry e tipizzazione in biologia molecolare

Microarray-based genotyping for blood groups: comparison of gene array and 5′-nuclease assay techniques with human platelet antigen as a model

Peter Bugert, Simon McBride,* Graham Smith, Alex Dugrillon, Harald Klüter, Willem H. Ouwehand, and Paul Metcalfe*

High-throughput multiplex single-nucleotide polymorphism analysis for red cell and platelet antigen genotypes

G.A. Denomme and M. Van Oene

Rapid genotyping of blood group antigens by multiplex polymerase chain reaction and DNA microarray hybridization

Sigrid H.W. Beiboer, Tinka Wieringa-Jelsma, Petra A. Maaskant-Van Wijk, C. Ellen van der Schoot, Rob van Zwieten, Dirk Roos, Johan T. den Dunnen, and Masja de Haas

A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing

Ghazala Hashmi, Tasmia Shariff, Michael Seul, Prabhakar Vissavajjhala, Kim Hue-Roye, Dalisay Charles-Pierre, Christine Lomas-Francis, Asok Chaudhuri, and Marion E. Reid

Transfusion May 2005 Vol 45

HEA BeadChips™

Tecnologia:

- Permette di tipizzare 32 antigeni eritrocitari e HbS (RHCE, KEL, FY, DO, LW, CO, SC, LU, DI, JK, MNS)
- Impiega biglie marcate con una varietà di coloranti fluorescenti legate covalentemente con sonde specifiche per i diversi alleli
- I chip contenenti circa 4000 biglie sono montati su vetrini o su piastra
- Il segnale di fluorescenza viene letto da un microscopio automatico ed analizzato dal software BASIS che converte il segnale in fenotipo

BLOODchip Reference

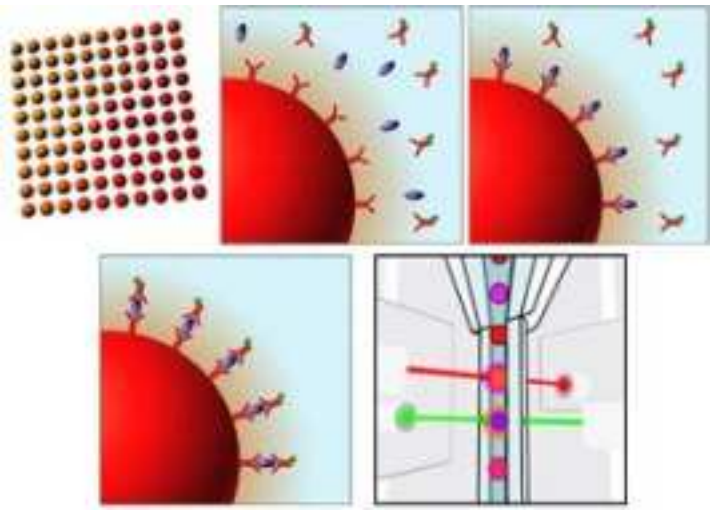
Tecnologia:

- Permette di analizzare 116 SNPs per determinare 10 gruppi sanguigni: ABO, RHD , RHCE, KEL, JK, FY, MNS, DI, DO, CO, LU
- I chip sono vetrini sulla cui superficie sono fissate le sonde complementari agli SNPs d'interesse
- Le sonde sono spottate in specifici punti del vetrino
- Il segnale di fluorescenza viene letto da uno scanner ed analizzato da un software che converte il segnale in fenotipo

LUMINEX TM

Tecnologia:

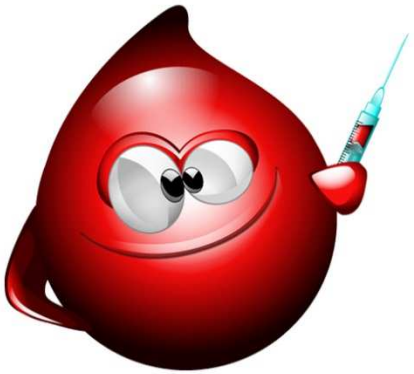
- Tecnologia che impiega microsfere fluorescenti a cui sono attaccate chimicamente delle sonde specifiche per i diversi alleli degli antigeni eritrocitari
- Le sonde sono complementari al filamento con l'estremità biotinilata.
- Impiega microsfere di polistirene in fase solubile marcate con differenti intensità di rosso ed infrarosso legate covalentemente con le sonde
- L'analisi delle reazioni viene effettuato mediante lo strumento Luminex 100/200 TM system dotato di 2 laser



A chi applicarle:

- Pazienti: fornisce un fenotipo esteso

- Donatori: aumenta la disponibilità di donatori estensivamente tipizzati



FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO
Sistema Sanitario Regione Lombardia

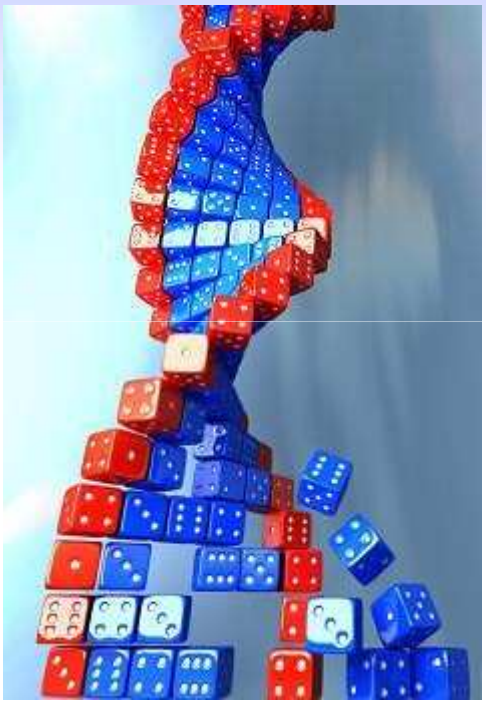
Vantaggi delle tecniche molecolari nel Laboratorio di Immunoematologia

- L'integrazione delle tecniche di biologia molecolare con la sierologia permette di migliorare la cura del paziente in modo particolare quando è difficile avere una tipizzazione attendibile:

✓ Pazienti con autoanticorpi

✓ Pazienti politrasfusi

- Permette di assicurare una trasfusione efficace e sicura prevenendo l'alloimmunizzazione attraverso un "matching esteso"



Applicazione delle tecniche molecolari nel Laboratorio di Immunoematologia

- Nei pazienti con autoanticorpi caldi

✓ E' necessario eseguire ad ogni evento trasfusionale studi di assorbimento per escludere la presenza di alloanticorpi

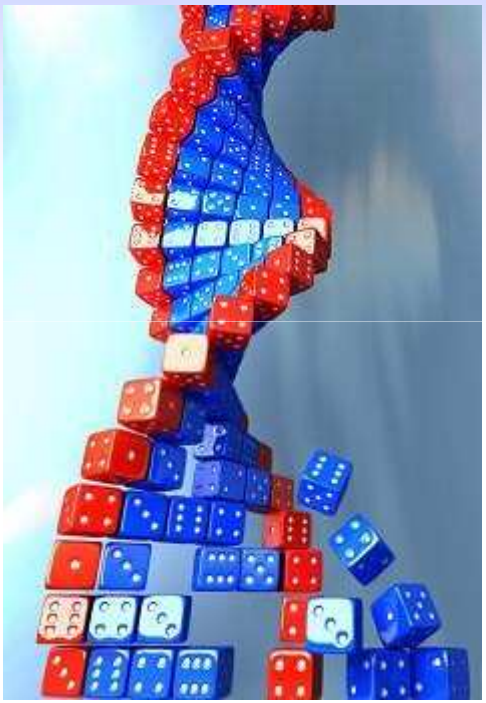
oppure

✓ Si può eseguire una tipizzazione molecolare per determinare il fenotipo del paziente ed assegnare unità a fenotipo identico per prevenire l'alloimmunizzazione ed evitare i successivi assorbimenti

Applicazioni delle tecniche molecolari nel Laboratorio di Immunoematologia

- Pazienti affetti da talassemia

✓ Hanno un alta percentuale di alloimmunizzazione
✓ Alcuni pazienti potrebbero essere tipizzati in biologia molecolare altri no in accordo con il clinico



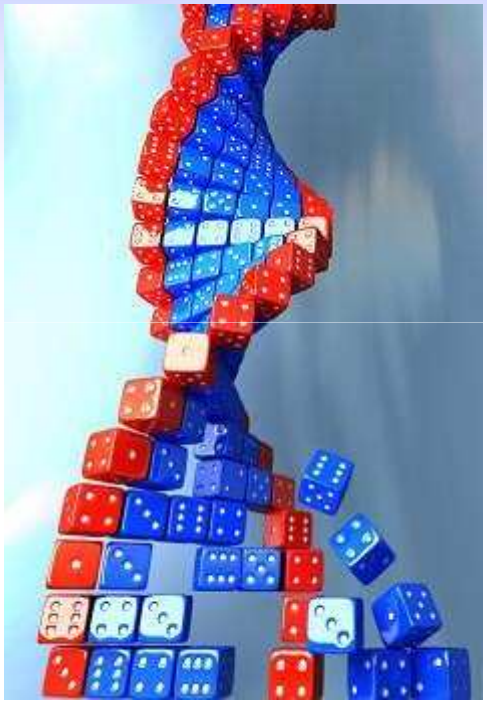
- Pazienti affetti da drepanocitosi

✓ Hanno un alta percentuale di immunizzazione
✓ Questi pazienti rappresentano un gruppo ad alto rischio di immunizzazione eritrocitaria
✓ Attualmente vengono trasfusi con unità identiche per gli antigeni: D, C, c, E, e, K

Applicazioni delle tecniche molecolari nel Laboratorio di Immunoematologia

- Determinare la specificità di un alloanticorpo versus un autoanticorpo:

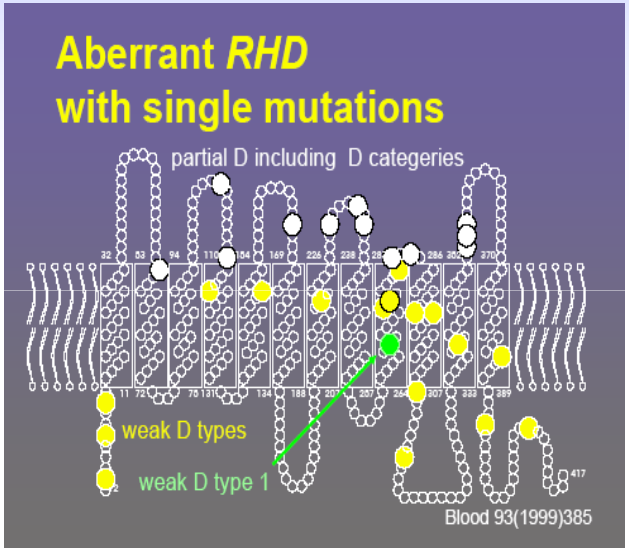
✓ Nel processo di identificazione la corretta determinazione della natura di un anticorpo mediante la tipizzazione genomica può aiutare nella selezione di unità di sangue negative per l'antigene implicato



Risoluzione delle discrepanze

Molti fenotipi Rh(D) non sono facilmente caratterizzabili con metodi sierologici anche con l'utilizzo combinato di diversi reagenti monoclonali

- ✓ Weak D
- ✓ Partial D



La tipizzazione genomica può aiutare a chiarire queste discrepanze e a selezionare unità di sangue negative per l'antigene implicato se indicato

FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO
Sistema Sanitario Regione Lombardia

Applicazioni delle tecniche molecolari nel Laboratorio di Immunoematologia

- Predire l'assetto genetico del feto per migliorare la gestione in gravidanze a rischio per la presenza di anticorpi di classe IgG

✓ Si può utilizzare il DNA fetale estratto da liquido amniotico, villi coriali o plasma materno per determinare la presenza o l'assenza dell'antigene implicato

- In caso di immunizzazione anti-D la determinazione della zigosità del partner può predire il rischio per il feto ed evitare esami

Vox Sanguinis (2004) 87, 225–232
© 2004 Blackwell Publishing

REVIEW

Fetal blood group genotyping from DNA from maternal plasma: an important advance in the management and prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn

G. Daniels,[1] K. Finning,[1] P. Martin[1] & P. Soothill[2]
[1]International Blood Group Reference Laboratory, Bristol Institute for Transfusion Sciences, National Blood Service, Bristol, UK
[2]Fetal Medicine Research Unit, Department of Obstetrics and Gynaecology, St Michael's Hospital, University of Bristol, Bristol, UK

Vox Sanguinis

The cloning of blood group genes and subsequent identification of the molecular bases of blood group polymorphisms has made it possible to predict blood group phenotypes from DNA with a reasonable degree of accuracy. The major application of this technology, which has now become the standard of care, is the determination of a fetal *RHD* genotype in women with anti-D, to assess whether the fetus is at risk of haemolytic disease of the fetus and newborn (HDFN). Initially, the procurement of fetal DNA required the invasive procedures of amniocentesis or chorionic villus sampling. Since the discovery of fetal DNA in maternal plasma in 1997, the technology of detecting an *RHD* gene in this very small quantity of fetal DNA has developed rapidly, so that non-invasive fetal D typing can now be provided as a diagnostic service for D-negative pregnant women with anti-D. Within a few years, it is probable that fetuses of all D-negative pregnant women will be tested for *RHD*, to establish whether the mother requires antenatal anti-D immunoglobulin prophylaxis.

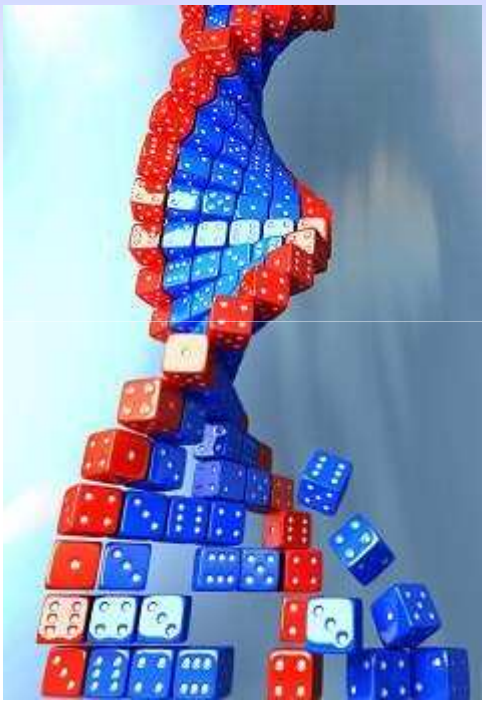
Received: 26 May 2004, revised 18 August 2004, accepted 24 August 2004

Key words: blood groups, fetal DNA, genotyping, maternal plasma, Rh.

Applicazioni delle tecniche molecolari nel Laboratorio di Immunoematologia

- Determinazione dell'antigene D weak in gravidanza:

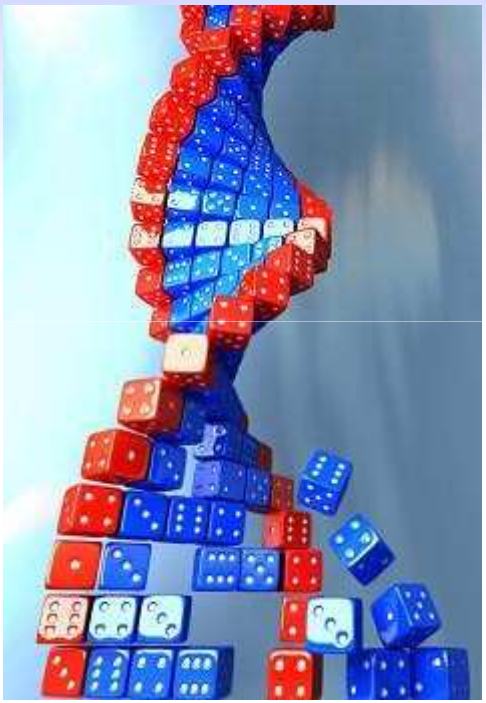
  Le donne in gravidanza potrebbero essere incorrettamente tipizzate come Rh(D) positive



✓ Identificare la presenza di un D weak o un partial D potrebbe diminuire le indagini sierologiche, permettere l'utilizzo di emazie Rh(D) positive ed evitare la somministrazione di immunoglobuline

Applicazioni delle tecniche molecolari nel Laboratorio di Immunoematologia

- Tipizzare i globuli rossi quando non ci sono antisieri commerciali o non sono facilmente disponibili come ad esempio per l'antigene Do^a, Do^b



✓ Degli antigeni che possiamo tipizzare in biologia molecolare usando delle piattaforme commerciali circa il **40%** rientra in questa categoria

Immunizzazione

- Nel **95%** delle trasfusioni il sangue viene reperito facilmente, senza dare problemi ai riceventi
- Nel **5%** delle trasfusioni c'è maggiore difficoltà a trovare sangue compatibile a causa dell'immunizzazione dei riceventi:

Devono essere selezionate unità di sangue negative anche per altri antigeni eritrocitari diversi da AB0 ed Rh

FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO
Sistema Sanitario Regione Lombardia

Il sangue di gruppo raro e' quello che manca al momento del bisogno

I donatori di gruppo raro sono classificati in due categorie:

1. **Negativi per antigeni multipli dei sistemi comuni** (frequenza 1:1.000 - 1:5.000)

2. **Negativi per antigeni ad alta incidenza** (estremamente rari, frequenza <1:5.000 nei donatori random)

Standards: American Rare Donor Program (ARDP), Council of Europe, International Donor Panel (IDP) - International Society of Blood Transfusion (ISBT), Council of Europe, Japanese Red Cross

Per sopperire alla mancanza di sangue compatibile nei casi di immunizzazione diventa indispensabile l'istituzione di Registri o Banche di Sangue Raro

FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO
Sistema Sanitario Regione Lombardia

La Banca di Emocomponenti di Gruppi Rari
Centro di Riferimento della Regione Lombardia

- Attiva dal Gennaio 2005; coinvolge 15 DMTE lombardi

- In base alla convezione stipulata con la Regione, la Banca ha sede presso la Fondazione IRCCS *Cà Granda* Ospedale Maggiore Policlinico di Milano

- Il progetto è stato rinnovato anche per il triennio 2011-2013

Obiettivi della Banca

- Identificare donatori di gruppo sanguigno raro per antigeni eritrocitari e piastrinici
- Gestire le unità congelate di gruppo sanguigno raro della Regione Lombardia
- Allestire un Registro Regionale di donatori rari
- Allestire un laboratorio di immunoematologia in grado di eseguire indagini di II livello e studiare casi di complessa immunizzazione eritrocitaria e piastrinica
- Gestire richieste di unità di gruppo raro per soggetti con quadri di complessa immunizzazione

FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO
Sistema Sanitario Regione Lombardia

Quali donatori tipizzare?

Età	≤ 55 anni
Gruppi sanguigni	0 e A
Fenotipi Rh	CCDee, ccdee, ccDee, ccDEE
N. di donazioni	≥ 2

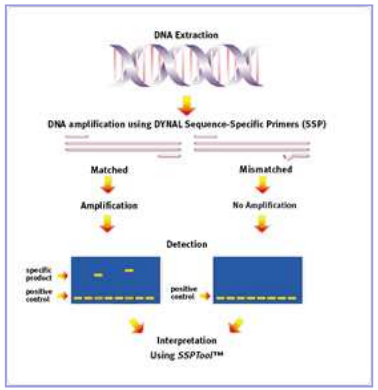
FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO
Sistema Sanitario Regione Lombardia

Tecniche di tipizzazione 2005-2008

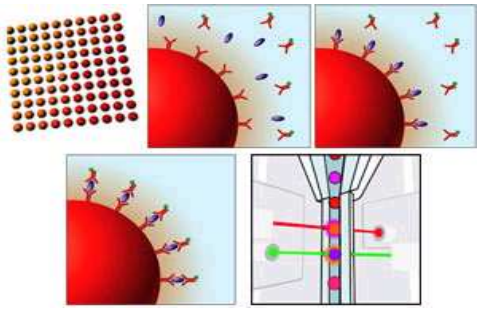
Tipizzazione eritrocitaria estesa in agglutinazione su tutti i donatori eseguita con strumento automatico ad alta produttività (Galileo – Immucor) per i seguenti antigeni eritrocitari:

Antigeni eritrocitari														
Fy^a	Fy^b	Jk^a	Jk^b	S	s	Co^a	Js^b	Ge	Lu^b	Kp^b	PP_1P^k	U	Vel	Yt^a

SSP-PCR



Luminex



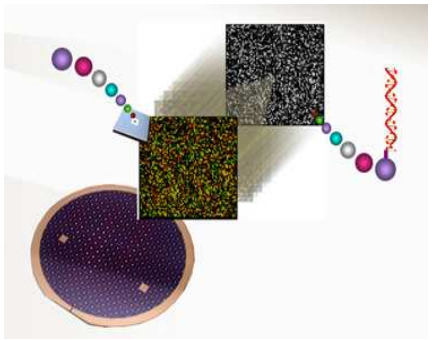
Da giugno 2005 a dicembre 2008

Utilizzo di tecniche di analisi molecolare per la conferma delle tipizzazioni dei donatori di gruppo raro per antigeni ad alta incidenza e per combinazione di antigeni

Introduzione della Biologia Molecolare

2009-2010

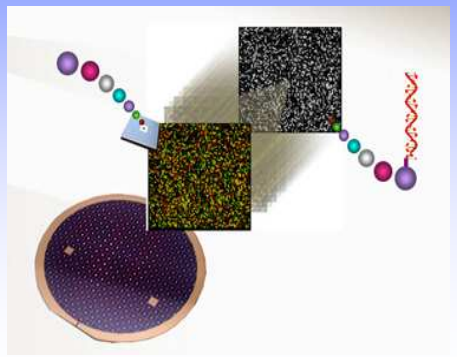
Introduzione di tecniche di biologia molecolare per la tipizzazioni dei donatori **candidati** per 33 antigeni eritrocitari **(BeadChip – Immucor)**.

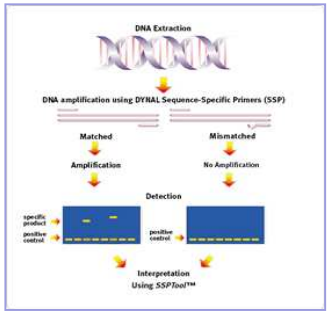


FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO
Sistema Sanitario Regione Lombardia

Fasi di lavoro

- Tipizzazioni sui candidati donatori eseguite in biologia molecolare con l'impiego di una tecnologia ad elevata produttività *(MicroArray)*
- Conferma delle tipizzazioni effettuate in sierologia con lo strumento Galileo – Immucor
- Conferma delle tipizzazioni se antisiero non disponibili o eventuali discrepanze con SSP-PCR *(BaGene e Innotrain)*

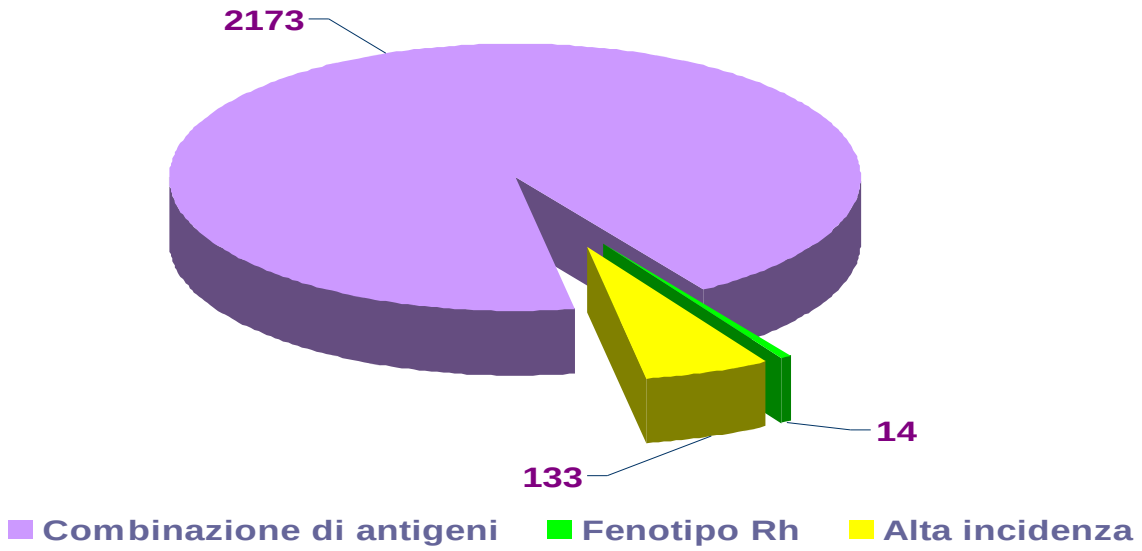




FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO
Sistema Sanitario Regione Lombardia

Inventario attuali dei donatori tipizzati con tecniche di biologia molecolare

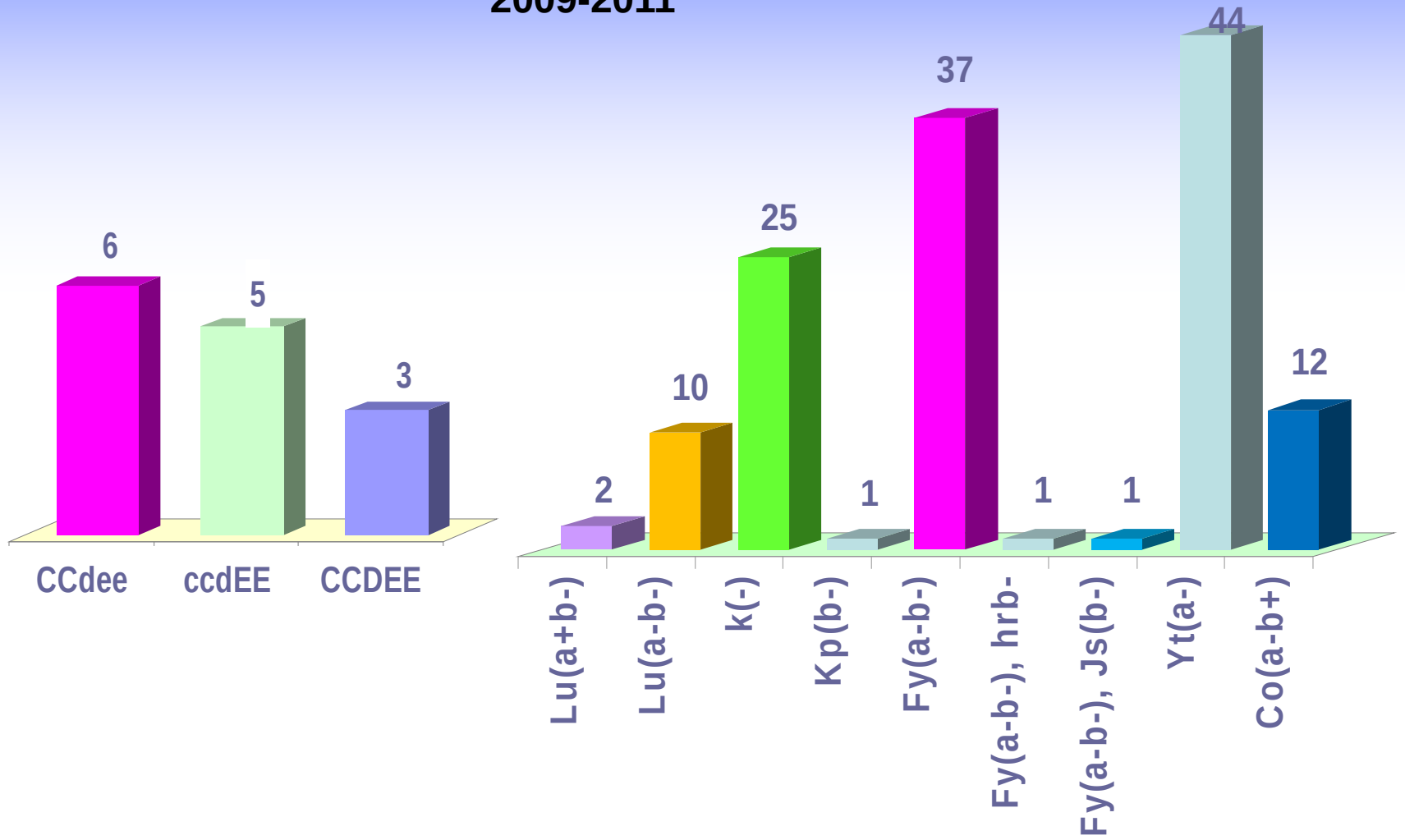
Dal 2009 ad oggi sono
stati tipizzati con il kit HEA BeadChip™ 12.683 donatori di e sono
stati individuati 2.320 donatori rari per antigeni eritrocitari



FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO
Sistema Sanitario Regione Lombardia

Fenotipi rari identificati

2009-2011



FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO
Sistema Sanitario Regione Lombardia

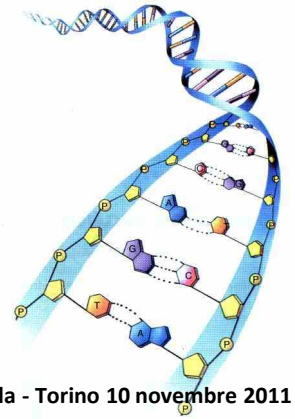
Inventario unità rare congelate

National Frozen Blood Bank (Bristol UK), Sanguin Bank of Frozen Blood (Amsterdam NL),
Banca Rari Lombardia (Milano IT)

Antigene raro	National Frozen Blood Bank	Sanguin Bank of Frozen Blood	Banca Rari Lombardia
Oh	12	11	**14**
CDE/CDE	5	--	**14**
CdE/CdE	--	2	--
C^wD-/C^wD-	--	--	--
-D-/-D-	--	--	**7**
Rh_{null}	--	5	--
Rh:-51	--	--	--
LW(a-b+)	--	11	--
LW(a-b-)	--	--	--
S-s-U-	37	21	**1**
S-s-U(+)	--	--	--
pp	2	38	**11**
Pk	5	3	**2**
Lu(a+b-)	32	49	**100**
Lu(a-b-)	37	13	**30**
Kp(a+b-)	37	39	--
Kp(a-b-)	--	--	--
Js(a+b-)	18	--	**4**
Ko	12	4	--
K:-11	--	--	--
Fy(a-b-)	69	75	**81**
Jk(a-b-)	19	3	--
Di(b-)	--	1	--
Sc:-1	7	--	--
Co(a-)	44	24	**41**
Co(a-b-)	--	--	--
Do(a-)	9	--	--
Vel-	30	120	**19**
Ge-	--	22	**21**
Lan-	--	2	--
Jr(a-)	3	15	--
k	--	--	**87**
Yta	--	--	**144**

Considerazioni

- Il genotipo non è il fenotipo
- Falsi risultati positivi dovuti alla presenza di alleli null o falsi risultati negativi dovuti a mutazioni che interferiscono con l'amplificazione o con l'ibridazione devono essere tenuti in conto



Perché la tipizzazione in biologia molecolare?

✓ Importante per alcune categorie di pazienti
✓ Parte integrante nel laboratorio per migliorare la cura del paziente
✓ Per risolvere le discrepanze nelle tipizzazioni problematiche
✓ Nel laboratorio di immunoematologia di riferimento
✓ Nei programmi di tipizzazione su larga scala dei donatori di sangue

E la sierologia?

EDITORIAL

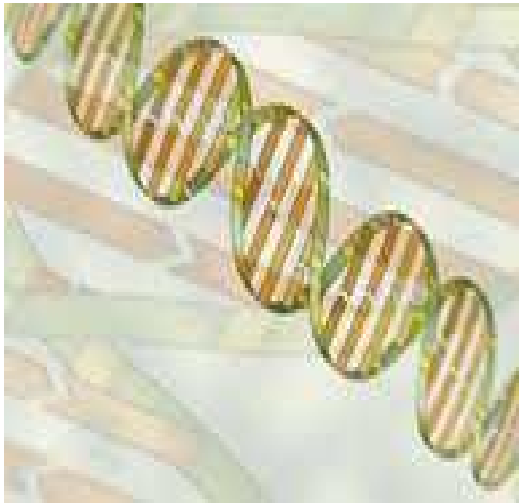
Goodbye to agglutination and all that?

David J. Anstee
Director, Bristol Institute for Transfusion Sciences
Southmead Road
Bristol BS10 5ND, UK
e-mail: david.anstee@nbs.nhs.uk

652 TRANSFUSION Volume 45, May 2005

Qual è il futuro?

I metodi di **biologia molecolare** applicati all'immunoematologia sono un valido strumento, associato o in alternativa, ai metodi sierologici nella diagnostica immunoematologica e nella medicina trasfusionale



FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO
Sistema Sanitario Regione Lombardia

Laboratorio di immunoematologia

FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO
Sistema Sanitario Regione Lombardia

Grazie per l'attenzione