

7<sup>^</sup>

# Conferenza Nazionale dei Servizi Trasfusionali

Vicenza | 24-26 maggio 2023



## La diagnostica immunoematologica molecolare: quando applicarla in modo appropriato

***Dott.ssa Donatella Londero***  
***Laboratorio Immunoematologia e Immunogenetica***  
***Dipartimento Medicina Trasfusionale Udine***



**ASU FC**  
Azienda sanitaria  
universitaria  
Friuli Centrale



REGIONE AUTONOMA  
FRIULI VENEZIA GIULIA

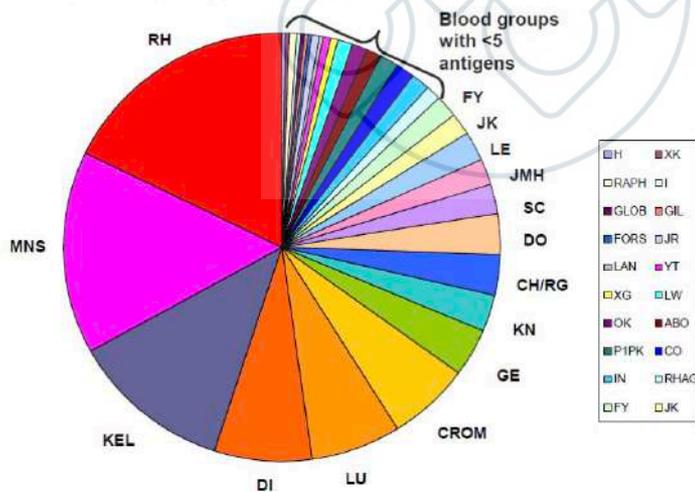
La sottoscritta, in qualità di Relatrice  
dichiara che

*nell'esercizio della Sua funzione e per l'evento in oggetto, NON È in alcun modo portatrice di interessi commerciali propri o di terzi; e che gli eventuali rapporti avuti negli ultimi due anni con soggetti portatori di interessi commerciali non sono tali da permettere a tali soggetti di influenzare le sue funzioni al fine di trarne vantaggio.*



- ▶ **Sistemi:**
- 43 Sistemi Gruppo-ematici**
- 343 Antigeni**
- 45 Geni**
- >2000 Alleli**

- ▶ **Collections (200 series)**
- ▶ **Antigeni ad alta incidenza (901 series)**
- ▶ **Antigeni a bassa incidenza (700 series)**



## Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology

Table of blood group systems v. 10.1 30-SEP-2022

No.	System name	System symbol	Gene name(s)*	LRG	Number of antigens	Chromosomal location	CD numbers
001	ABO	ABO	ABO	792	4	9q34.2	
002	MNS	MNS	GYPB, GYPB, (GYPE)	793; 794	50	4q31.21	CD235a CD235b
003	P1PK	P1PK	A4GALT	795	3	22q13.2	CD77
004	Rh	RH	RHD, RHCE	796; 797	56	1p36.11	CD240
005	Lutheran	LU	BCAM	798	26	19q13.2	CD239
006	Kell	KEL	KEL	799	37	7q33	CD238
007	Lewis	LE	FUT3	800	6	19p13.3	
008	Duffy	FY	ACKR1	801	5	1q21-q22	CD234
009	Kidd	JK	SLC14A1	802	3	18q11-q12	
010	Diego	DI	SLC4A1	803	23	17q21.31	CD233
011	Yt	YT	ACHE	804	6	7q22	
012	Xg	XG	XG, CD99	805; 1023	2	Xp22.32	CD99†
013	Scianna	SC	ERMAP	806	9	1p34.2	
014	Donnerick	DO	ART4	807	10	12p13-p12	CD297
015	Colton	CO	AQP1	808	4	7p14	
016	Landsteiner-Wiener	LW	ICAMA4	809	4	19p13.2	CD242
017	Chido/Rodgers	CH/RG	C4A, C4B	117-118	0	6p21.3	
018	H	H	FUT1; FUT2	810; 811	1	19q13.33	CD173
019	Kx	XX	XX	812	1	Xp21.1	
020	Gerbich	GE	GYPC	813	13	2q14-q21	CD236
021	Cromer	CROM	CD55	127	20	1q32	CD55
022	Knops	KN	CR1	814	12	1q32.2	CD35
023	Indian	IN	CD44	815	6	11p13	CD44
024	Ok	OK	BSG	816	3	19p13.3	CD147
025	Raph	RAPH	CD151	817	1	11p15.5	CD151
026	John Milton Hagen	JMH	SEMA7A	818	8	15q22.3-q23	CD108
027	I	I	GCNT2	819	1	6p24.2	
028	Globoside	GLOB	B3GALNT1	820	3	3q25	
029	Gill	GIL	AQP3	821	1	9p13	
030	Rh-associated glycoprotein	RHAG	RHAG	822	5	6p12.3	CD241
031	FORS	FORS	GBGT1	826	1	9q34.13-q34.3	
032	JR	JR	ABC2	823	1	4q22.1	CD338
033	LAN	LAN	ABC86	824	1	2q36	
034	Vel	VEL	SMIM1	827	1	1p36.32	
035	CD59	CD59	CD59	41	1	11p13	CD59
036	Augustine	AUG	SLC29A1	1027	4	6p21.1	
037	Kanno	KANNO	PRNP		1	20p13	
038	SID	SID	B4GALNT2		1	17q21.32	
039	CTL2	CTL2	SLC44A2		2	19p13.2	
040	PEL	PEL	ABCC4	1183	1	13q32.1	
041	MAM	MAM	EMP3		1	19q13.33	
042	EMM	EMM	PIGG		1	4p16.3	
043	ABCC1	ABCC1	ABCC1		1	16p13.11	

# Vantaggi della tipizzazione molecolare rispetto alla sierologia



Tipizzazione Molecolare	Tipizzazione Sierologica
DNA ricavabile da fonti diverse	Necessita globuli rossi freschi
Non legata a disponibilità reagenti	Richiede disponibilità di antisieri
Risultato netto (se nota base molecolare)	Possibili risultati discordanti (reagente/metodo dipendenti)
No interferenza con emazie trasfuse	Interferenza con emazie trasfuse
Strumentazioni e kit ad alta produttività	Minor produttività

# Analisi Dati Letteratura

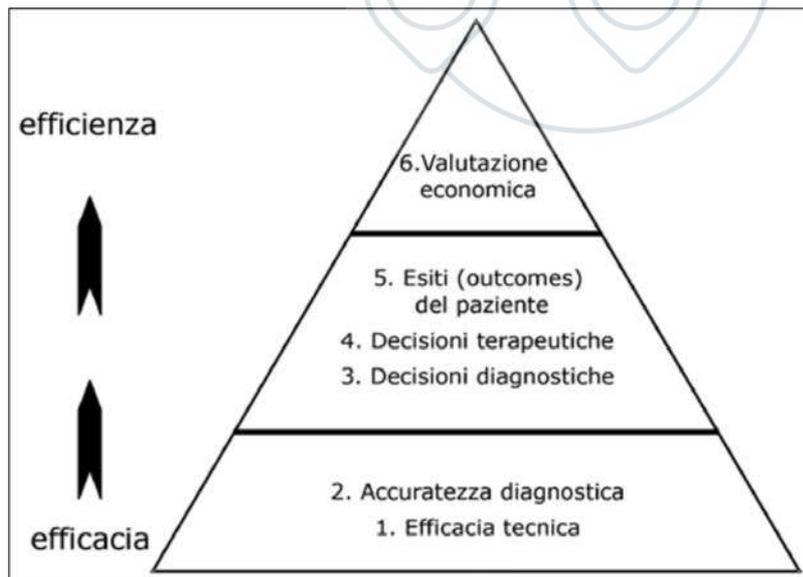
Scenario	Donors	Patients	References
Predict antigen status when reagents unavailable (e.g., hr <sup>B</sup> , hr <sup>S</sup> , Jo <sup>a</sup> , Hy, U)	✓	✓	Reid <sup>23</sup>
Predict antigen status when weak antigens can be missed serologically (e.g., Fy <sup>b</sup> , D)	✓	✓	Olsson et al. <sup>24</sup> ; Londero et al. <sup>25</sup>
Predict antigen status when antibody-coated RBCs hamper serologic typing	N/A	✓	El Kenz et al. <sup>26</sup>
Predict antigen status when recent transfusion hampers serologic typing	N/A	✓	Reid et al. <sup>27</sup>
Predict antigen status when variant antigen is suspected to be causing typing discrepancy (current vs. historic, reagent 1 vs. reagent 2, method 1 vs. method 2, molecular vs. serologic)	✓	✓	Arnoni et al. <sup>28</sup>
Predict antigen status when variant antigen is suspected based on alloimmunization (e.g., e+ with anti-e)	N/A	✓	Reid <sup>29</sup>
Identify alleles encoding partial antigens when allele matching of donors and patients may be considered	✓	✓	Fasano et al. <sup>30</sup>
Efficiently identify antigen-negative status for multiple antigens simultaneously	✓	✓	Hashmi et al. <sup>9</sup> ; Hashmi et al. <sup>31</sup>
Predict antigen status in reagent red cells used for antibody screening	✓	✓	Storry et al. <sup>32</sup>
Determine impact of unlinked genetic factors on antigen expression [e.g., In(Lu)]	✓	✓	Singleton et al. <sup>33</sup>
Determine zygosity as it relates to HDFN	N/A	✓	Pirelli et al. <sup>34</sup>
Determine zygosity as it relates to reagent red cells used for antibody screening	✓	✓	Storry et al. <sup>32</sup>

M.A. Keller, *Immunohematology* (2015)

# Appropriatezza Diagnostica

L'**appropriatezza** definisce la misura di quanto una procedura diagnostica sia adeguata rispetto alle esigenze del paziente e al contesto sanitario, con un bilancio positivo tra benefici, rischi e costi.

Test appropriato se soddisfa criteri di **efficacia, sicurezza ed efficienza**



EBM classifica la valutazione dei test diagnostici con una piramide gerarchica che muove dall'efficacia verso l'efficienza: efficacia tecnica, accuratezza diagnostica, decisione diagnostica, decisione terapeutica, esito per paziente, valutazione economica. Ogni livello è necessario a sostenere i successivi, ma solo all'apice si può ottenere la reale efficienza.

# Test Appropriato

- Anche in IE, **appropriato** è il test in cui il risultato fornisce una risposta al quesito clinico e mette in grado di prendere una decisione o intraprendere un'azione
- Nel valutare quindi l'introduzione di un nuovo test o di una nuova metodica, sarà necessario considerarne l'efficienza e l'efficacia, ovvero se **produce l'effetto richiesto** (es: match più completo, diagnosi prenatale Rh) e lo fa **con alta qualità**, determinando un vantaggio per il paziente/donatore.



# Genotipizzazione Pazienti Ambito Trasfusionale



- Tipizzare pazienti recentemente trasfusi
- Tipizzare pazienti con emazie sensibilizzate (DAT+)
- Tipizzare pazienti in terapia con Ab monoclonali
- Tipizzare pazienti con antigeni rari o a bassa espressività
- Risolvere discrepanze di tipizzazione
- Tipizzare pazienti trasfusione-dipendenti (SCD, THAL, MDS)
- Tipizzare pazienti con immunizzazione complessa
- Tipizzare pazienti sottoposti a trapianto di CSE ABO inc.



# Genotipizzazione Pazienti Ambito Ostetrico-Prenatale



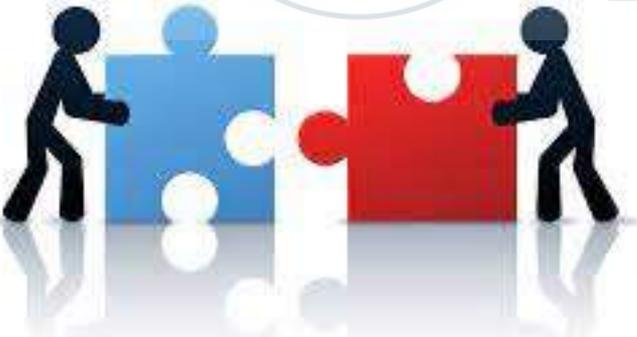
- Tipizzare pazienti ostetriche per identificare varianti RhD per appropriatezza immunoprofilassi
- Studiare zigosità paterna in caso di alloimmunizzazione anti-D materna
- Determinare *RHD*\* fetale per individuare rischio HDN
- Determinare *RHD*\* fetale per gestione antenatale profilassi
- Tipizzare sistema HPA (madre/padre, madre/neonato) per sospetta o conferma FNAITP



# Genotipizzazione Donatori

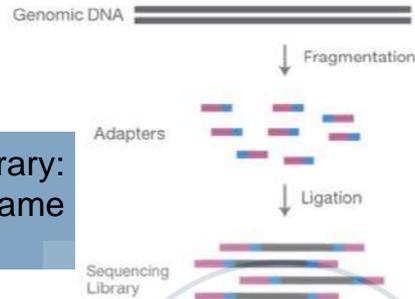


- Tipizzare per risolvere discrepanze sierologiche
- Tipizzare per caratterizzare antigeni varianti
- Tipizzare per migliorare il matching donatore /ricevente
- Tipizzare su larga scala per aumentare scorta di unità Ag neg
- Tipizzare per istituire **Banca/Registro Donatori Rari**



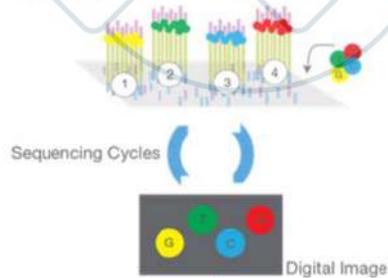
# Next Generation Sequencing (NGS)

## A. Library Preparation



NGS library is prepared by fragmenting a gDNA sample and ligating specialized adapters to both fragment ends.

## C. Sequencing



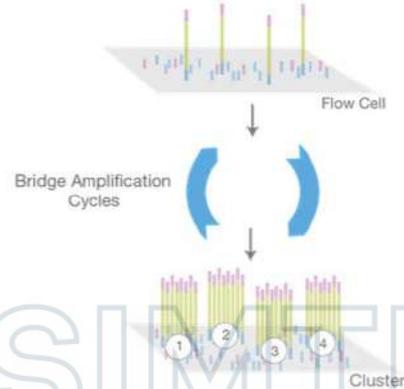
Data is exported to an output file

```
Cluster 1 > Read 1: GAGT...
Cluster 2 > Read 2: TTGA...
Cluster 3 > Read 3: CTAG...
Cluster 4 > Read 4: ATAC...
```

Text File

Sequencing reagents, including fluorescently labeled nucleotides, are added and the first base is incorporated. The flow cell is imaged and the emission from each cluster is recorded. The emission wavelength and intensity are used to identify the base. This cycle is repeated "n" times to create a read length of "n" bases.

## B. Cluster Amplification



Library is loaded into a flow cell and the fragments are hybridized to the flow cell surface. Each bound fragment is amplified into a clonal cluster through bridge amplification.

## D. Alignment and Data Analysis

Reads

```
ATGGCATTGCAATTTGACAT
TGGCATTGCAATTTG
AGATGGTATTG
GATGGCATTGCAA
GCATTGCAATTTGAC
ATGGCATTGCAATT
AGATGGCATTGCAATTTG
```

Reference Genome

```
AGATGGTATTGCAATTTGACAT
```

Reads are aligned to a reference sequence with bioinformatics software. After alignment, differences between the reference genome and the newly sequenced reads can be identified.

Preparazione della Library: frammentazione DNA e legame di adattatori

Amplificazione a ponte dei Target e formazione dei Cluster

Sequenziamento e produzione immagini

Analisi dei frammenti ottenuti da parte di software che utilizzano algoritmi informatici

# Next Generation Sequencing (NGS)

Transfusion Medicine  
and Hemotherapy

## Review Article

Transfus Med Hemother 2020;47:4–13  
DOI: 10.1159/000504765

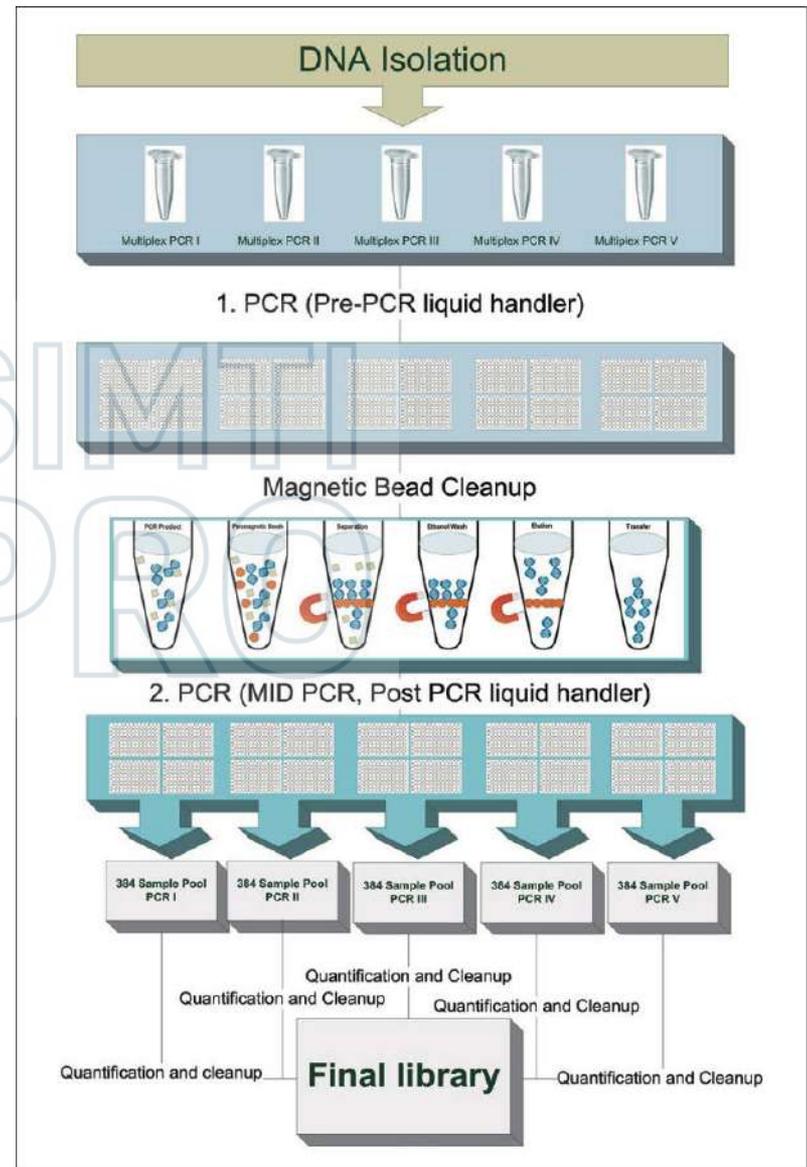
Received: August 1, 2019  
Accepted: November 7, 2019  
Published online: December 11, 2019

## Next-Generation Sequencing Technologies in Blood Group Typing

Daniel Fürst Chrysanthi Tsamadou Christine Neuchel Hubert Schrezenmeier  
Joannis Mytilineos Christof Weinstock

Institute for Clinical Transfusion Medicine and Immunogenetics Ulm, German Red Cross Blood Transfusion Service,  
Baden Wuerttemberg/Hessen, and University Hospital Ulm, Ulm, Germany; Institute of Transfusion Medicine,  
University of Ulm, Ulm, Germany

Protocollo di screening in cui  
sono presenti due diverse librerie  
con differenti set di primers



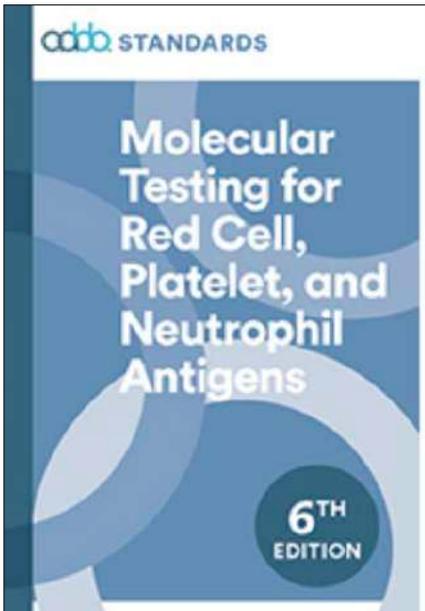
# Istituzione di una rete nazionale per la gestione dei Donatori di gruppo raro

## Criteri per la selezione

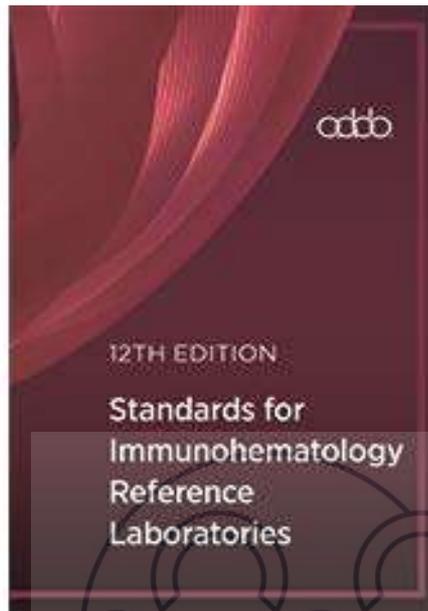
	Etnia caucasica	Etnia non caucasica
Età	18-55	tutti
N. Donazioni sangue intero	$\geq 2$	tutti
Gruppo ABO	O, A	tutti
Fenotipo Rh	CCDee, ccdee, ccDee, ccDEE	tutti



Sviluppo di una rete nazionale per la gestione dei donatori di gruppo raro operante con procedure riconosciute a livello nazionale per le attività di tipizzazione dei donatori e per la gestione delle unità di sangue raro per fenotipo ad alta incidenza



**AABB**



**SIMTI**



- ☑ Stabilire i requisiti per implementare l'attività (in termini di allestimento del laboratorio, personale, numero test)
- ☑ Definire appropriatezza test molecolari
- ☑ Dare indicazioni sulla interpretazione e gestione dei risultati
- ☑ Definire standard di qualità



Raccomandazioni per l'impiego  
delle metodiche molecolari  
in immunoematologia

Gruppo di Redazione

Serelina Coluzzi, Donatella Londero, Silvia Manfroi,  
Antonella Matteocci, Simone Travali, Antonietta Villa

Edizione 2018



Standard per i Laboratori  
di Immunoematologia di  
Riferimento (LIR)  
e di Biologia Molecolare (LBM)

1ª Edizione - 2021

**ORGANIZZAZIONE** (personale e risorse)  
**METODI** (tecniche, strumenti, LIS)  
**DONATORI** (chi-che cosa-quando)  
**PAZIENTI** (chi-che cosa-quando)  
**GESTIONE DEI RISULTATI**



**SISTEMA GESTIONE QUALITA'**  
**GESTIONE DELLE RISORSE**  
**APPROVVIGIONAMENTI**  
**PRESTAZIONI**  
**PROCESSO DI EROGAZIONE SERVIZI**  
**MONITORAGGIO E MIGLIORAMENTO QUALITA'**



# Organizzazione-Personale

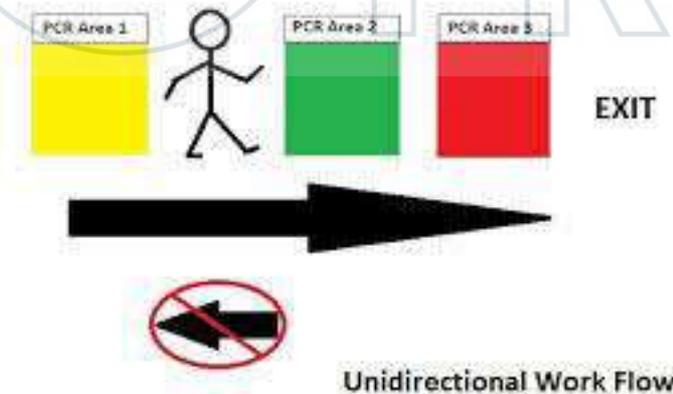
**Si raccomanda che il laboratorio che esegue test molecolari in IE:**

- Appartenga a una struttura Trasfusionale accreditata
- Diretto da Dirigente qualificato con almeno **5 anni** di esperienza in IE avanzata e **2 anni** in IE molecolare
- Esegua almeno **500 tipizzazioni** molecolari/anno su pazienti/donatori
- Disponga di **due metodiche differenti** di analisi molecolare
- Controlli il dato molecolare su **2° campione in sierologia**
- Partecipi ad almeno **2 esercizi/anno di VEQ**



# Organizzazione-Allestimento

- Devono essere presenti **Aree di Laboratorio separate** (flusso unidirezionale):
  - Area Estrazione DNA
  - Area allestimento Pre-PCR (area pulita)
  - Area analisi Post-PCR (area sporca)
- Devono essere presenti **strumentazioni, materiali e reagenti dedicati all'uso** per evitare contaminazioni



# Apparecchiature

## Operatività, Produttività, Applicazioni Cliniche



### Analisi a bassa produttività

PCR-RFLP

Test manuali; gel-  
electroforesi

Tipizzazione discrepanze;  
Identificazioni varianti

PCR-SSP



### Analisi a media produttività

Real-TIME PCR

Test semi-automatizzati;

Genotipo RHD\*fetale

Droplet Digital PCR

Lettura automatizzata dei  
risultati

Identificazione nuovi alleli

SBT

### Analisi ad alta produttività

Microarray

Piattaforme semi-  
automatizzate; SNPs  
panelli

Tipizzazione estesa

MALDI-TOF MS analysis

Rilevamento diretto

Screening donatori

NGS

Alta risoluzione; pannelli  
a più geni

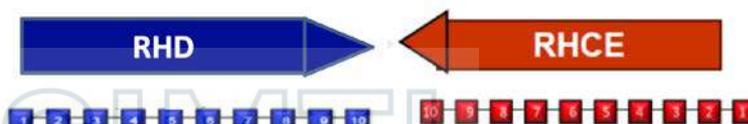
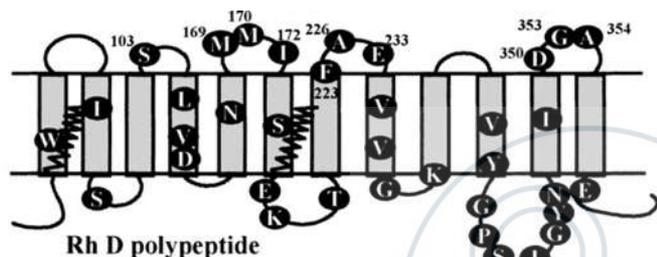
Sequenziamento genomico  
pazienti



Tutte le strumentazioni devono essere **qualificate, calibrate e sottoposte a manutenzione** a garanzia d'uso e i metodi analitici devono essere **validati** prima dell'uso e ri-validati ad intervalli regolari.

# Sistema Rh

La proteina RhD del sistema Rh porta l'antigene D con i suoi 30 epitopi ma la sua espressione può essere alterata o persa a causa di variazioni genetiche all'interno del gene *RHD*.

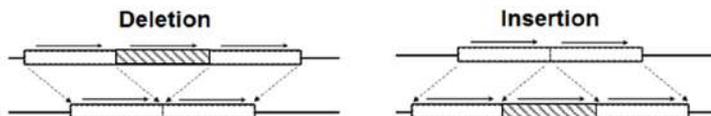


## Basi molecolari delle varianti alleliche (oltre 300 alleli *RHD*)

### Single Nucleotide Variants (SNVs)

Reference ATCCTTGGATGTTTCATCAGTT  
 SNV ATCCTTGGAGTTTCATCAGTT  
 Deletion ATCCTTGG   TCATCAGTT  
 Insertion ATCCTTGGAGCATGTTTCATCAGTT

### Insertions and Deletions (Indels)



### Structural Variants (SVs)

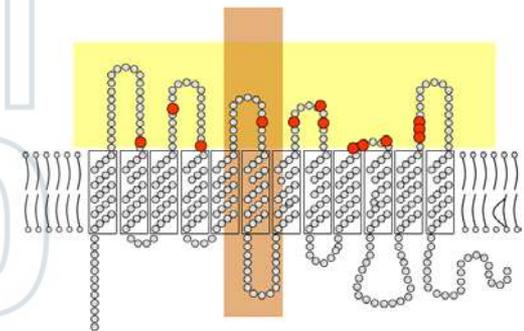
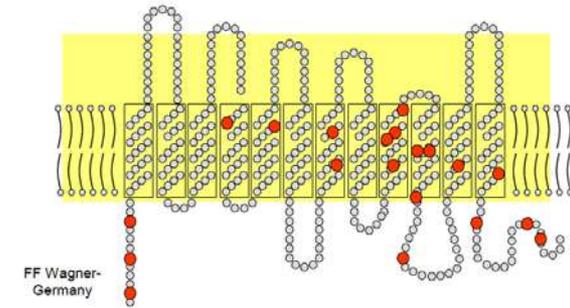


# Espressione antigene D

**I fenotipi D deboli (Weak D)** sono dovuti ad un gruppo di alleli presenti nello 0,2-1% dei Caucasici, derivati da mutazioni puntiformi che causano cambiamenti di uno o pochi AA nella zona transmembrana o citoplasmatica. Tra di essi il 95% appartiene al tipo 1,2,3 e non causano immunizzazione.

**I fenotipi D parziali** originano da diversi meccanismi molecolari che causano sostituzioni AA nei loop extracellulari della proteina D e causano la perdita di uno o più epitopi. Sono immunogeni.

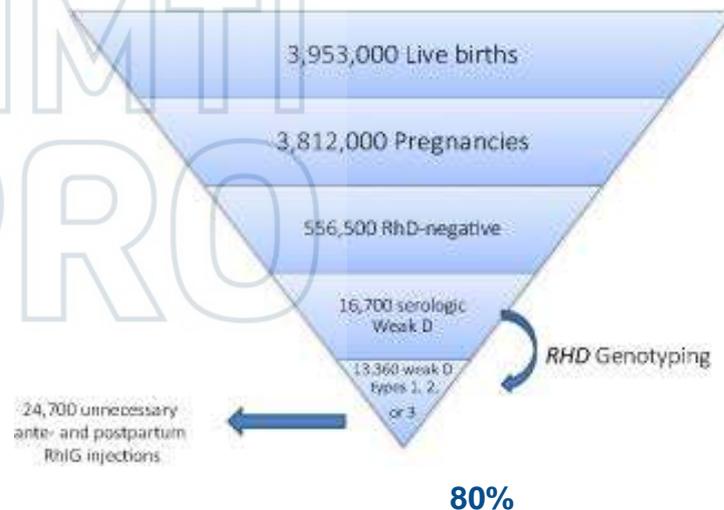
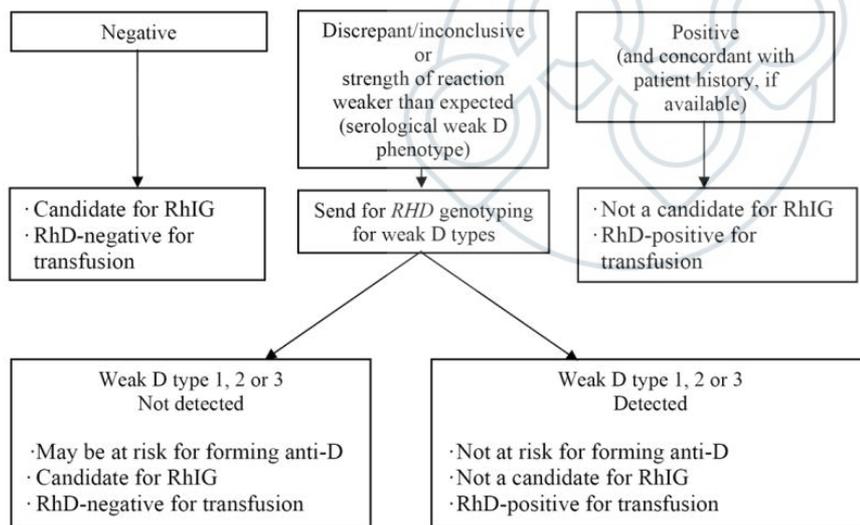
**I fenotipi DEL** rappresentano una forma molto debole dell'antigene D, con densità antigenica molto bassa e causano la perdita di uno o più epitopi. Sono fortemente immunogeni e spesso associati a distribuzione geografica (>30% pop. Asiatica D- è in realtà DEL).



# Screening dei fenotipi RhD deboli in sierologia

- ▶ Donatori di sangue
- ▶ Donne in gravidanza o con potenziale gravidico
- ▶ Screening RHD\*01W.1, \*01W.2, \*01W.3

Algoritmo per la risoluzione di tipizzazioni sierologiche D deboli con metodica molecolare ai fini della somministrazione mirata di RhIG e dell'appropriatezza trasfusionale



Sandler S.G., Flegel W.A., Westhoff C.M., et al. *Transfusion* 2015; 55 (3): 680-689

# Determinazione genotipo *RHD* fetale

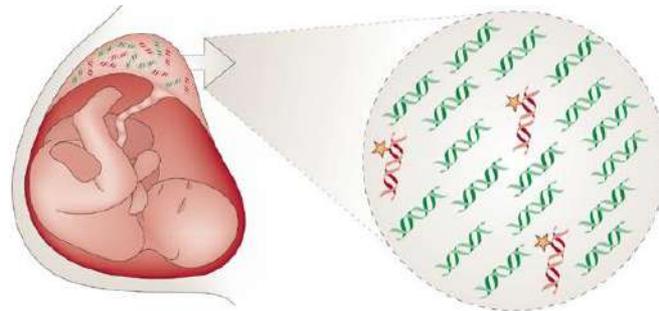


- Gravide RhD negative **alloimmunizzate** anti-D con partner RhD positivo eterozigote:
  - ➡ **Monitoraggio appropriato della gravidanza**
- Gravide RhD negative **non alloimmunizzate**:
  - ➡ **Appropriatezza nella somministrazione dell'IP prenatale**



# cfDNA

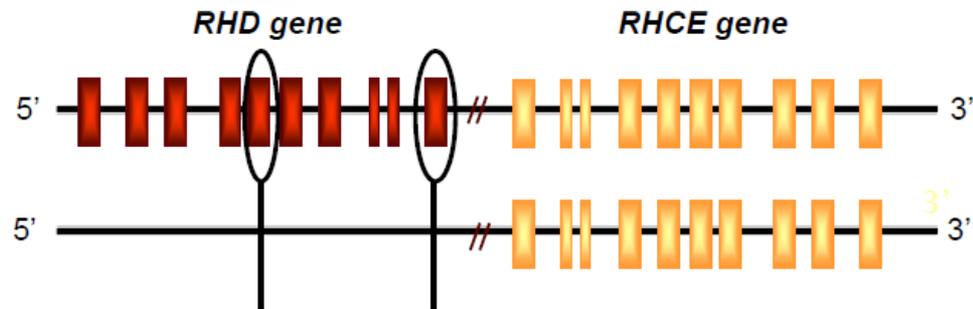
- ✓ Deriva da Cellule trofoblastiche della placenta
- ✓ Altamente frammentato (80% <150 bp)
- ✓ Rilevabile già dalla 4<sup>^</sup>/5<sup>^</sup> settimana
- ✓ Utilizzabile dalla 10<sup>^</sup>/11<sup>^</sup> settimana
- ✓ Aumenta con età gestazionale (10/15% cfDNA tot tra 10a-20a sg; +1% a sett dopo 21a sg)
- ✓ Rapida clearance (emivita 16min/120min dopo il parto)



# Caratteristiche del test per genotipo *RHD* fetale

Non individua direttamente il fenotipo D- fetale ma lo presume in base al risultato negativo ottenuto a seguito dell'amplificazione specifica di parti del gene

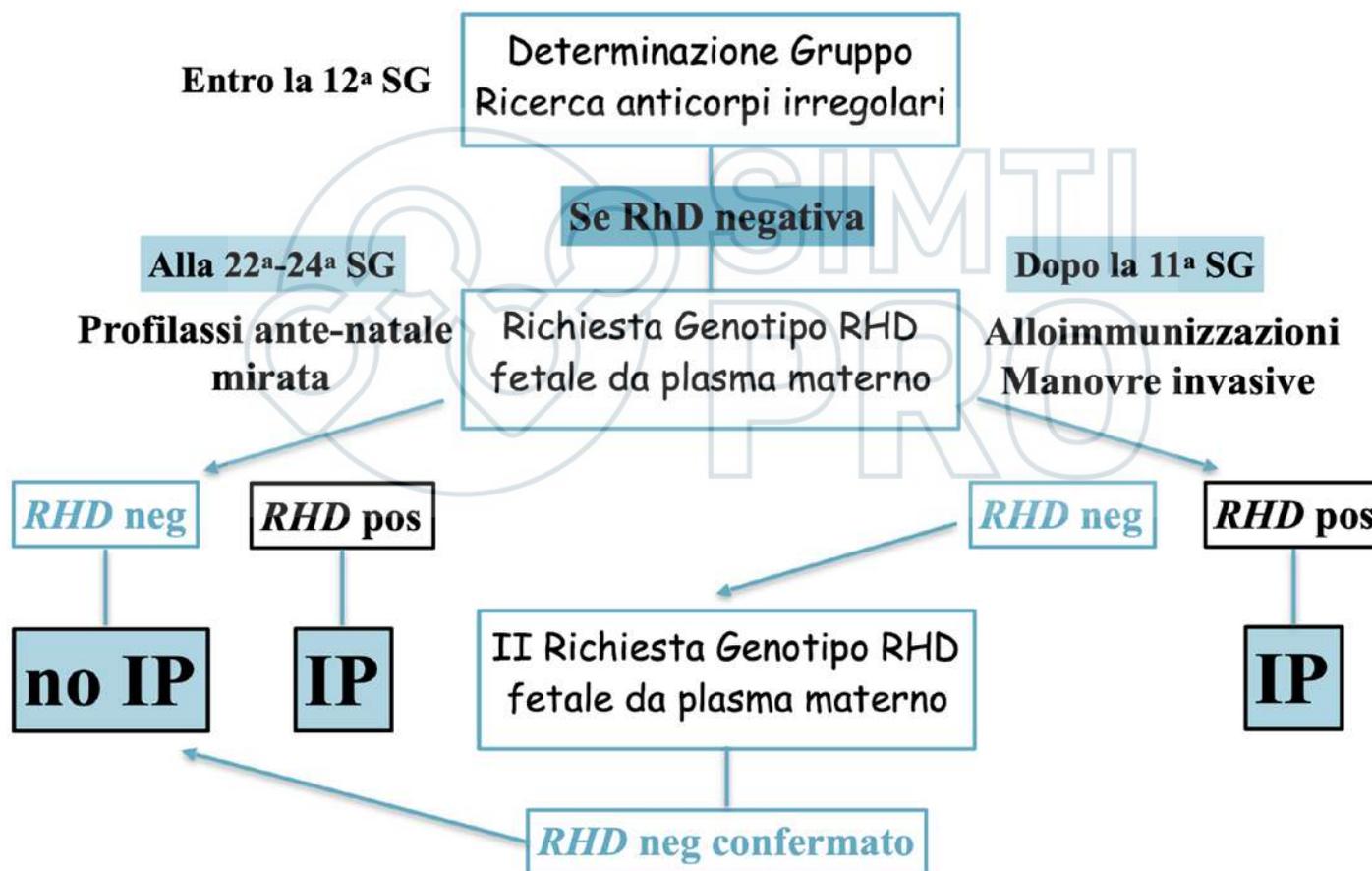
- **Efficienza** di estrazione: automazione e presenza di CQ interno
- **Specificità**: deve distinguere *RHD* da *RHCE*
- **Precisione**: amplificazione mirata di regioni del gene (5,7,10)
- **Sensibilità**: capacità di rilevazione in relazione alla SG



# Prenatal screening service for fetal RHD genotyping to guide prophylaxis: the two-year experience of the Friuli Venezia Giulia region in Italy

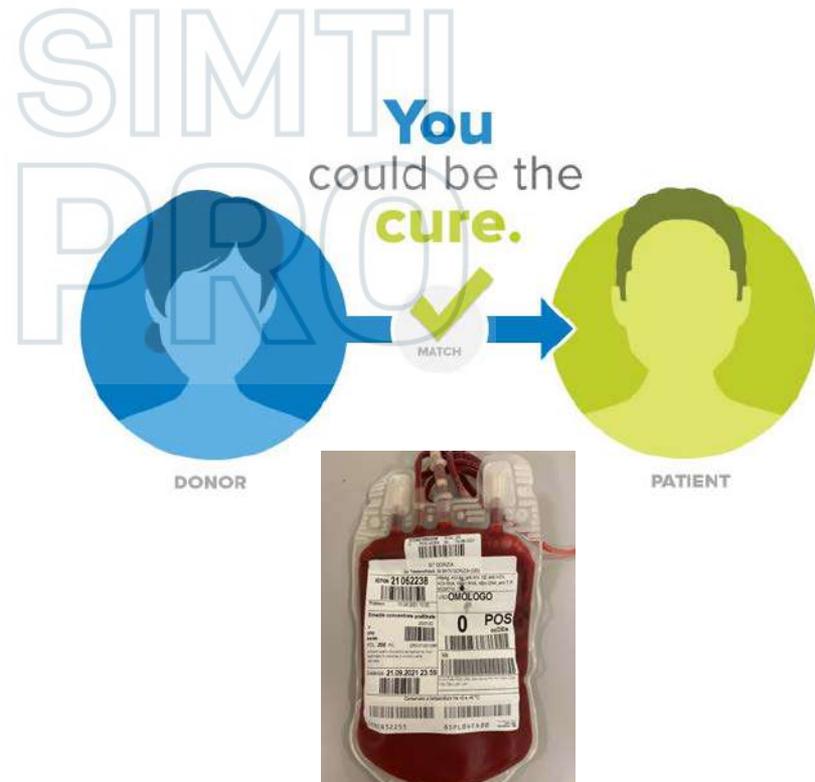
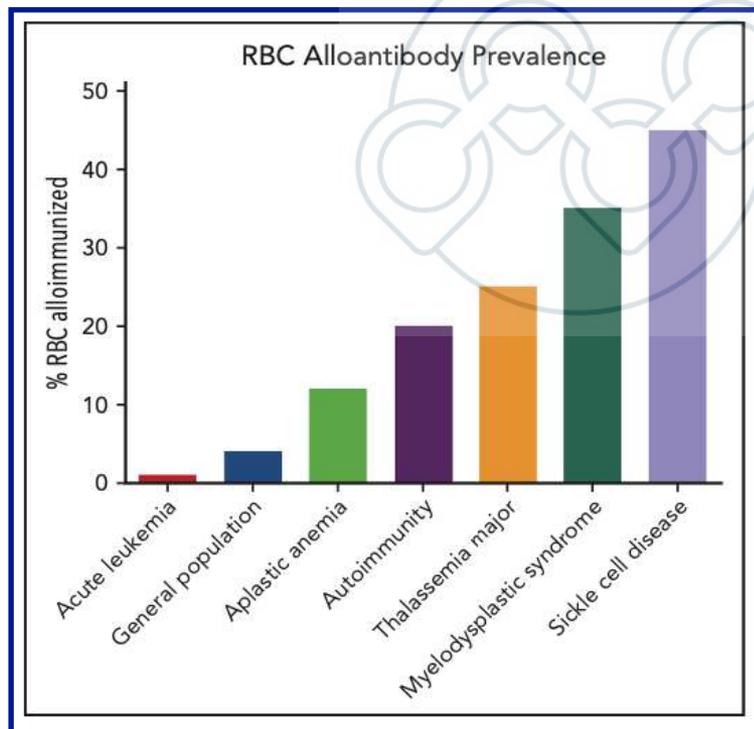
Londero D., Merluzzi S., Dreossi C., Barillari G.

Blood Transfus. 2022 May 30. doi: 10.2450/2022.0004-22.



# Tipizzazione molecolare estesa ricevente/donatore

- ▶ consente di aumentare il perfect match anche con antigeni minori e rappresenta la miglior strategia per **prevenire e ridurre alloimmunizzazione** ed effettuare trasfusione efficace
- ▶ **Tasso di immunizzazione >40%**(Anemie Falciformi, Sindromi mieloproliferative, Talassemia)



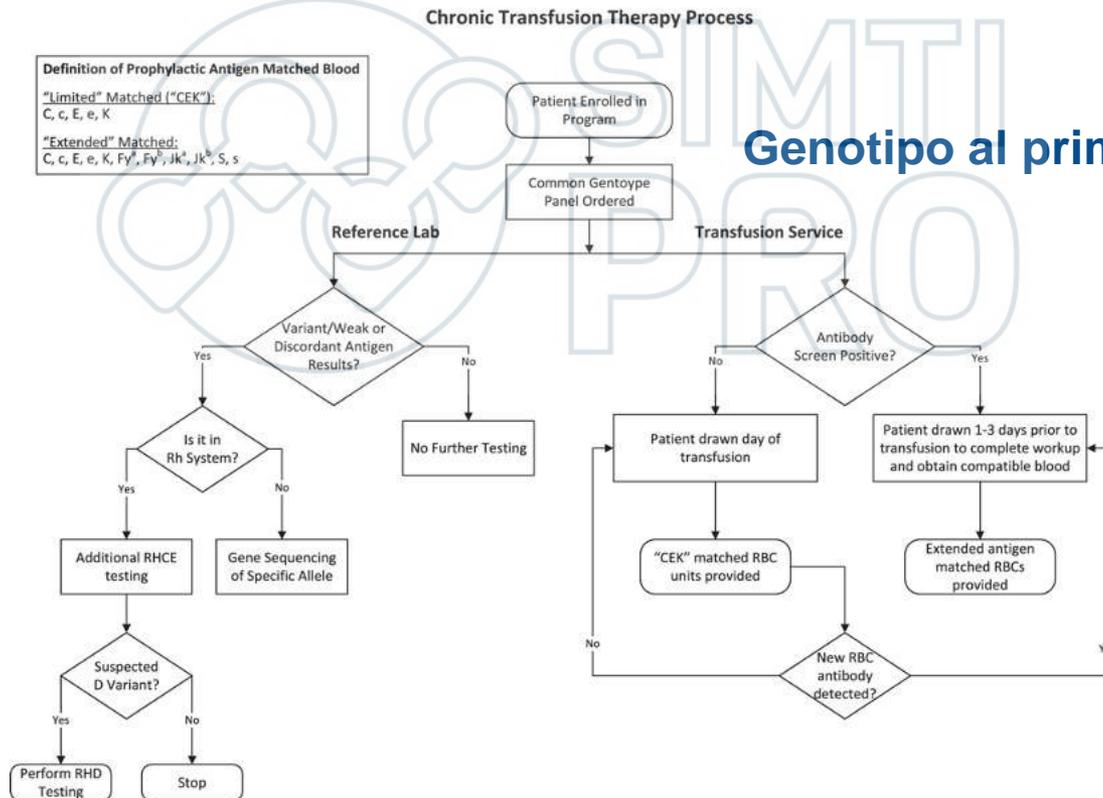
# How do I incorporate red cell genotyping to improve chronic transfusion therapy?

*Transfusion 2020; 60(1): 16-25*

Nancy L. Van Buren, Jed B. Gorlin, Susan M. Corby, Sandra Cassidy, Stephanie FritchLilla, Stephen C. Nelson, Connie M. Westhoff

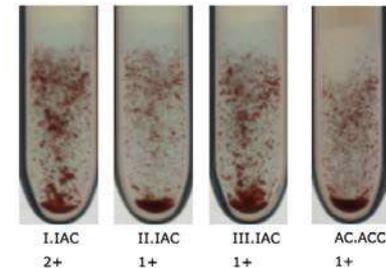
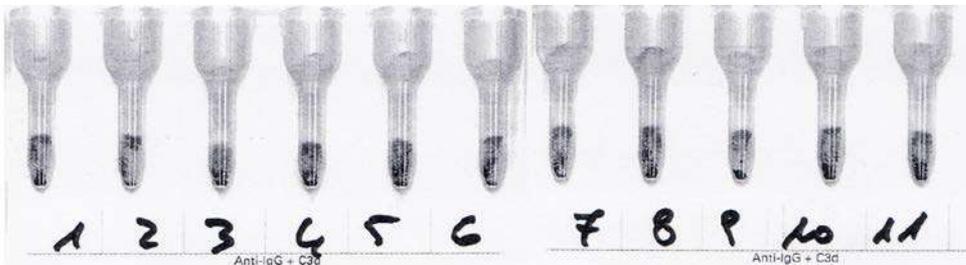
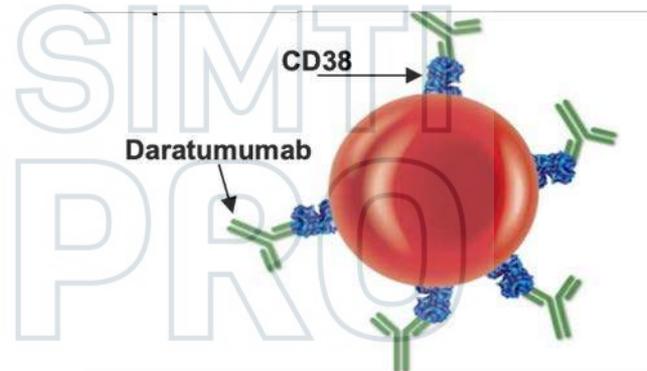
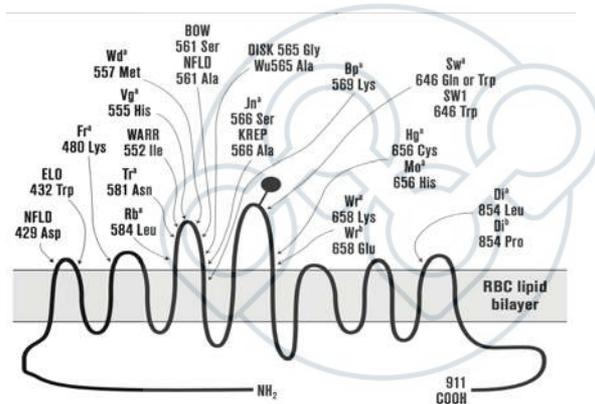


La tipizzazione estesa degli antigeni eritrocitari può essere incorporata nei programmi di terapia trasfusionale cronica (CTTP) per migliorare la cura dei pazienti pediatrici affetti da SCD e THAL



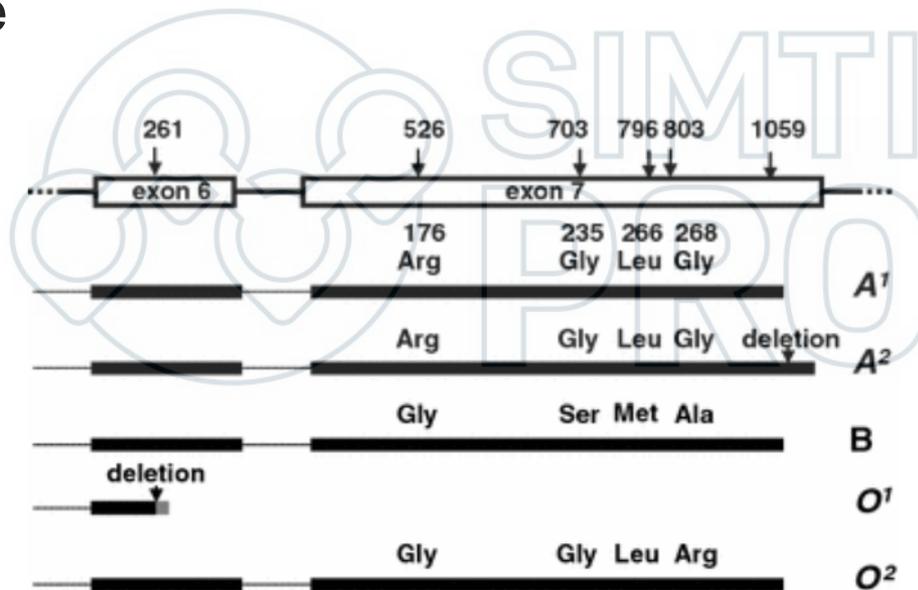
# Tipizzazione molecolare nella diagnostica

- ▶ risolve problemi di identificazione anticorpale:
- ▶ casi di immunizzazione complessa (es: Ag bassa incidenza)
- ▶ discriminazione auto/alloanticorpi
- ▶ farmaci che interferiscono test pre-trasfusionali (CD38, CD47)



# Tipizzazione molecolare ABO

- ▶ Non appropriata come test di routine
- ▶ Usata come test di approfondimento per sospette varianti
- ▶ Utile nel monitoraggio attecchimento e supporto trasfusionale dei pazienti sottoposti a trapianto allogenico di CSE ABO incompatibile



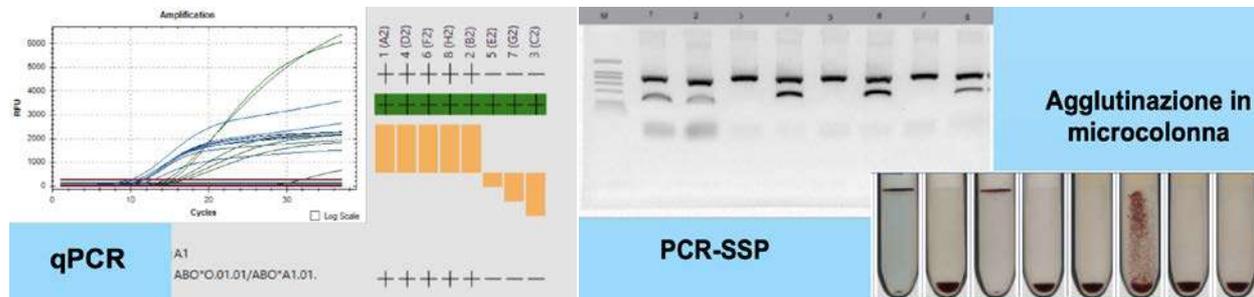
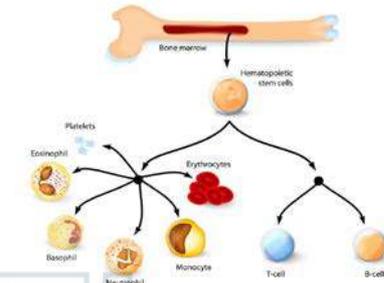
# Protocollo per la gestione trasfusionale del paziente sottoposto a trapianto di CSE ABO incompatibile

## ► 60-90 giorni dopo trapianto

### Tipizzazione molecolare *ABO\*/RHD\**

Ricerca e titolazione iso-emoagglutinine

- In presenza di **concordanza totale** tra il risultato della tipizzazione molecolare (fenotipo predetto) con quella sierologica (prova diretta ed indiretta) viene registrata sul sistema gestionale la conversione di gruppo



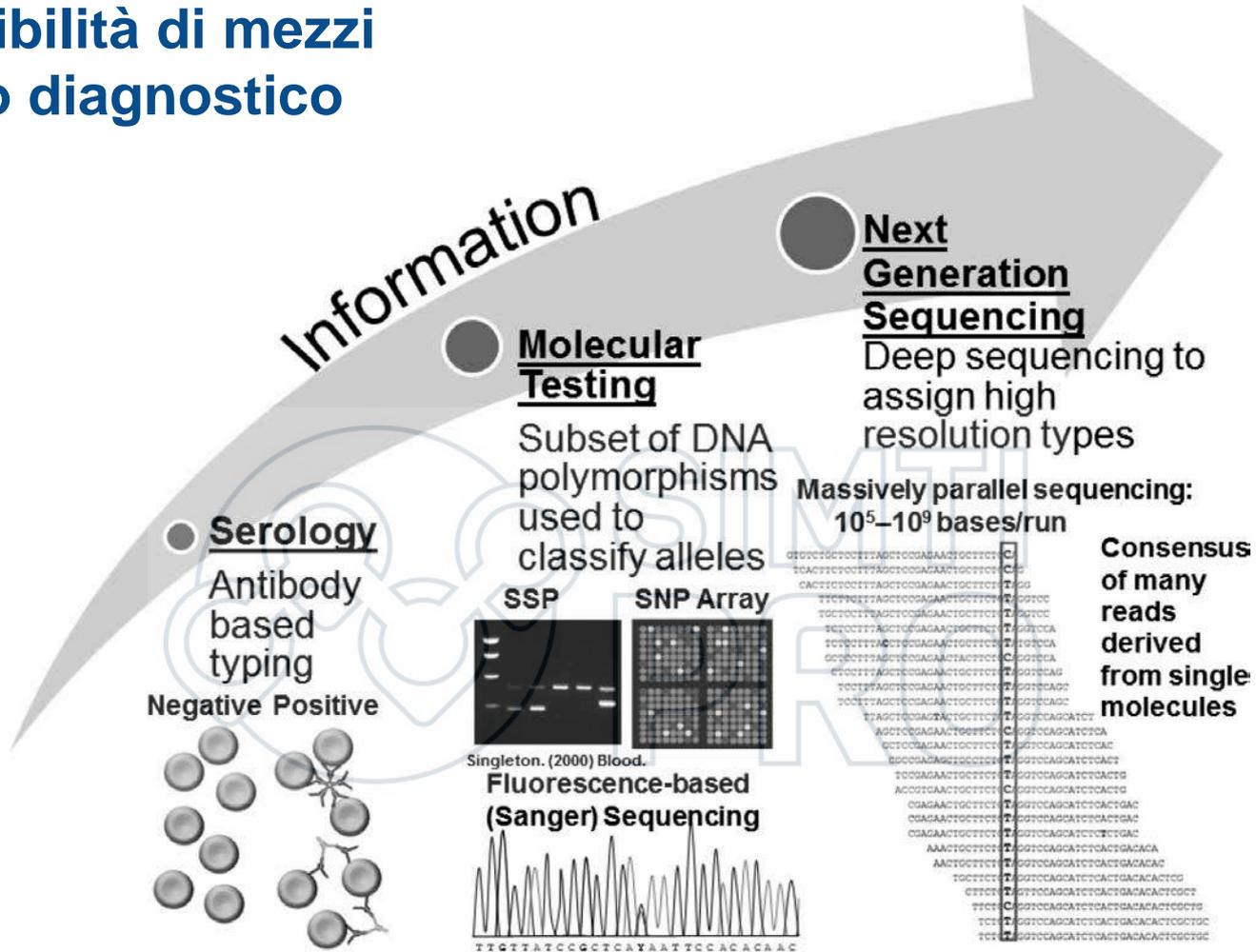
# Refertazione

- ▶ Risultato test molecolare deve essere **confermato** da test sierologico o da altro test molecolare
- ▶ In presenza di discrepanza di tipizzazione, il referto va gestito in **via cautelativa**
- ▶ Il Referto deve riportare **genotipo, fenotipo predetto**, commento e/o **conclusioni** diagnostico-cliniche

<b>Genotipo</b>	<b>Fenotipo predetto</b>
<b><i>RHD*01N.01/RHD*01W.1</i></b>	<b>Weak D Tipo 1</b>

I soggetti portatori dei fenotipi Weak D Tipo 1,2,3 non sono a rischio di immunizzazione e possono essere gestiti come Rh positivi sia come donatori che come riceventi

- ▶ **Disponibilità di mezzi**
- ▶ **Quesito diagnostico**



J.M. Johnsen, Hematology (2015)



## Limiti genotipizzazione

- Genotipo predice con elevata probabilità un determinato fenotipo
- Non è un dato assoluto ma deve avere un riscontro sierologico
- Evoluzione tecnologica non sempre garanzia di appropriatezza e sicurezza trasfusionale



La diagnostica immunoematologica molecolare risulta sicuramente appropriata in sempre maggiori campi di applicazione, ma deve essere utilizzata in maniera integrata con i test sierologici ed è condizionata da molti fattori che nell'ordine sono il quesito e l'urgenza clinica, la competenza del personale e le risorse a disposizione



*Grazie per l'attenzione*