

Inmunohematología molecular: donde estamos y para donde vamos

Lilian Castilho, PhD



Workshop Immucor

VI CONGRESO del GRUPO
COOPERATIVO de MEDICINA
TRANSFUSIONAL – G-CIAMT
Lima, 6 a 11/06/2009

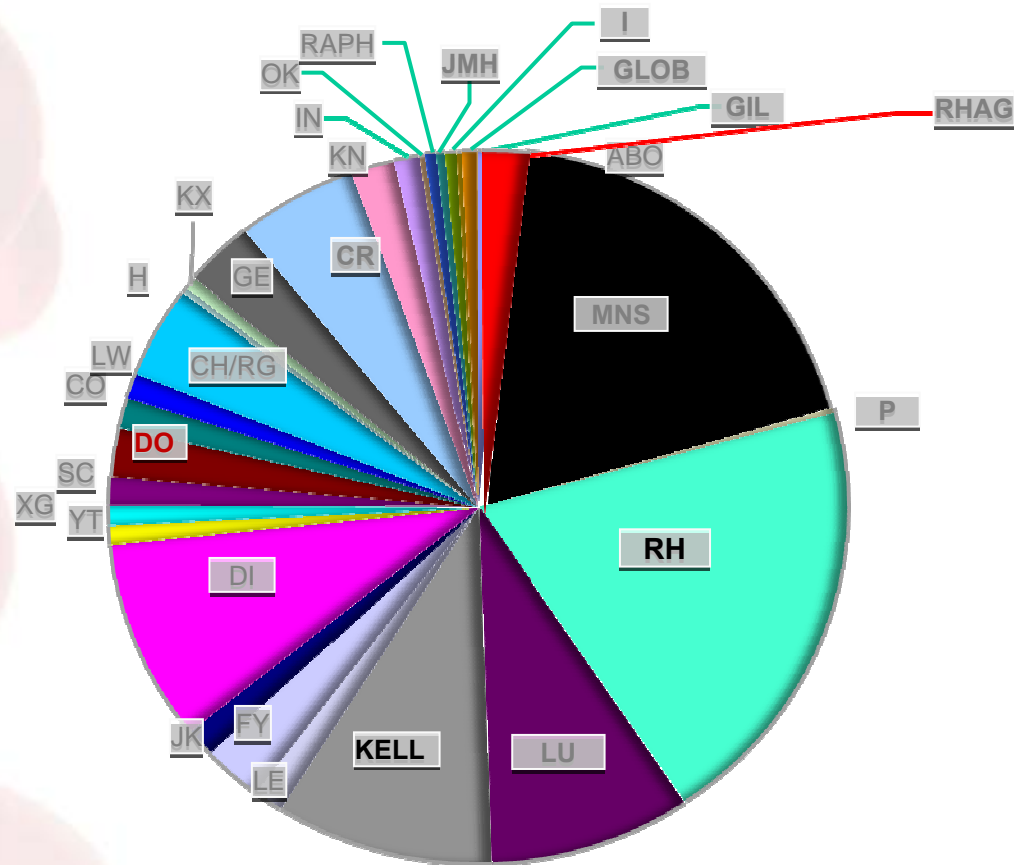
Que son los antígenos de grupos sanguíneos?

- Polimorfismos de proteínas i.e. diferencias de aminoácidos, que pueden ser reconocidas como extrañas por el sistema inmune
 - Ejemplos: C/c, E/e, K/k
- Moléculas de azúcar en cadenas terminales que son reconocidas por anticuerpos específicos
 - Ejemplos: A, B, P1
- Proteínas totales
 - Ejemplos: D, Jk3

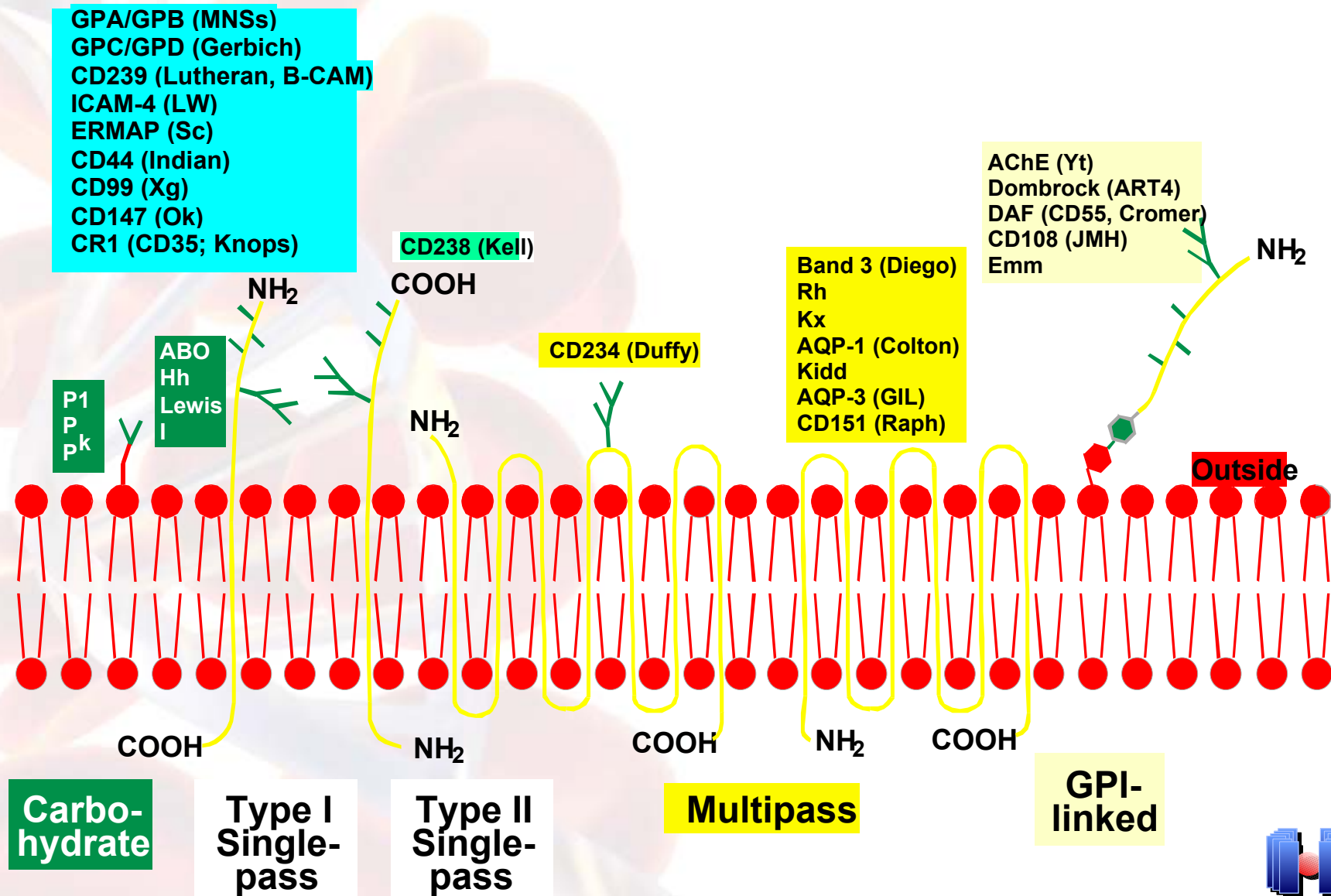
Antígenos de grupos sanguíneos constituyen los sistemas eritrocitarios

➤ Diversidad:

- Sistemas 30 (272 ags)
- Locus 34
- Antígenos 301
- Alos 950



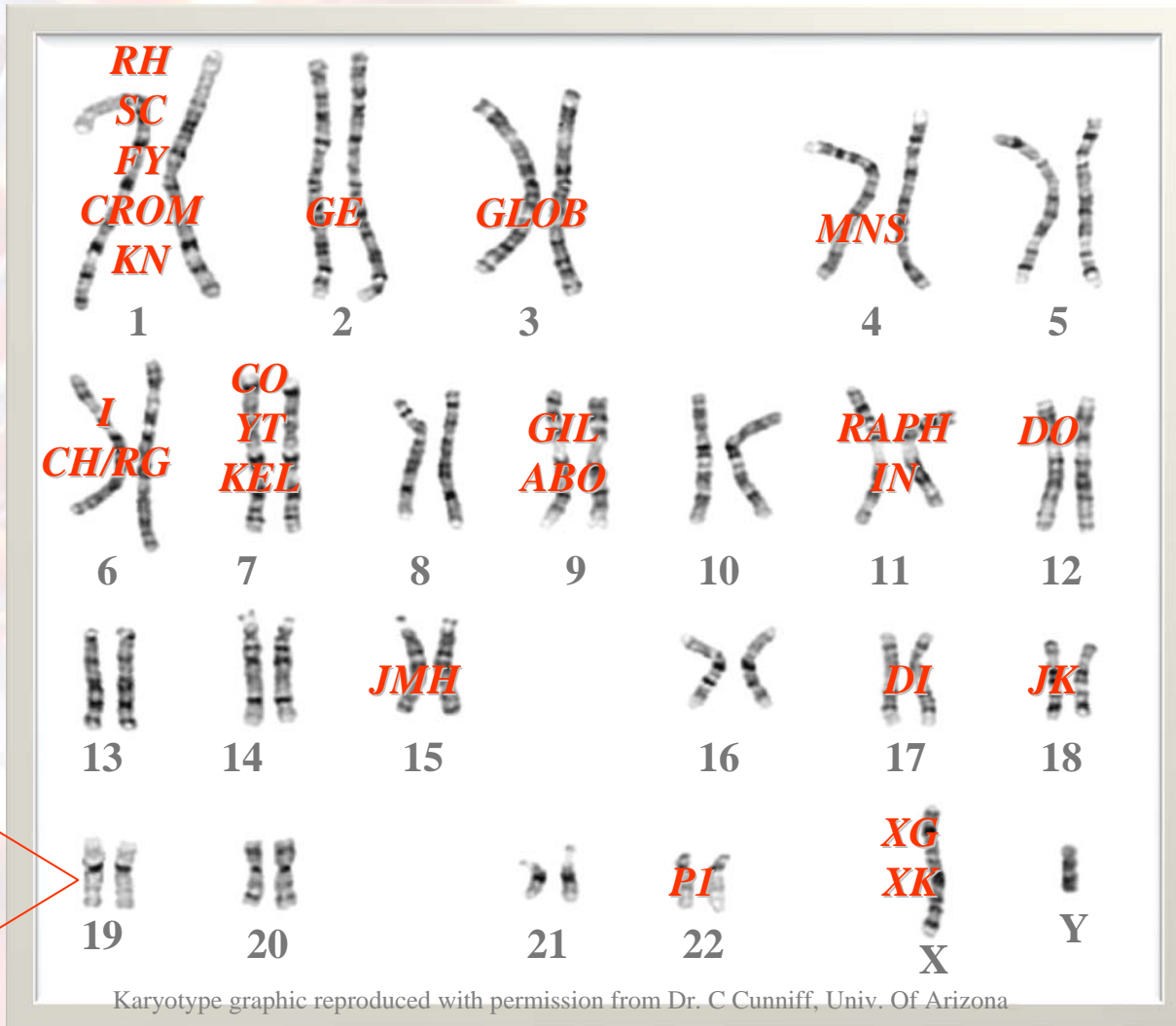
Modelo de membrana: inserción de los antígenos de grupos sanguíneos



Reid, 2004

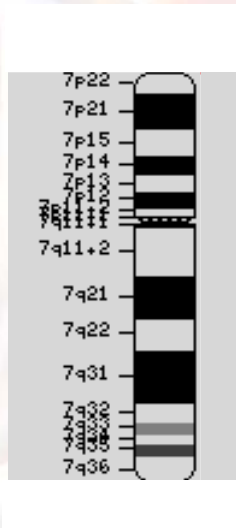


Antígenos de grupos sanguíneos son heredados



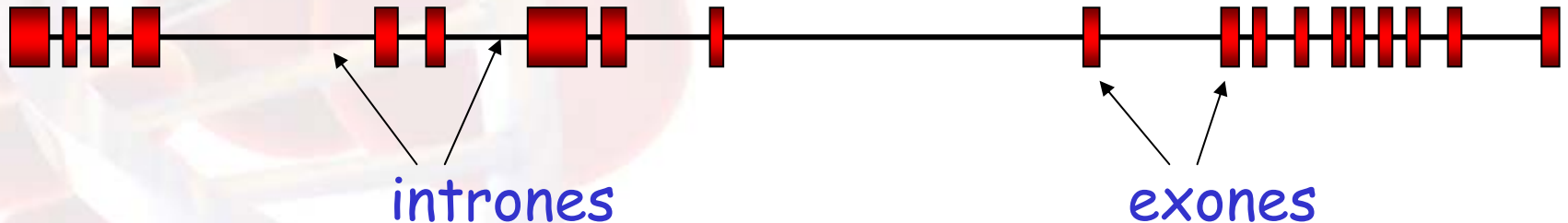
LE
OK
LW
LU
H

Que son los genes?



Cromosoma 7q33 - *KEL*

19 exones
21,5 kb



- 🔥 Exones contienen nucleotidos codificados
- 🔥 Intrones contienen nucleotidos no-codificados:
 - Un alto porcentaje de genes no codificado pero contienen importantes secuencias reguladoras

Antígenos de grupos sanguíneos son productos de los genes

- Antígenos cargados en **proteínas** son codificados directamente por el gen. Ex: *RH, KEL, FY*
- Antígenos **carbohidratos** están sobre el control de genes que codifican glicosiltransferases. Ex: *ABO, P1, H*

Antígenos de grupos sanguíneos son productos de los genes

- Bases moleculares de **29** de los 30 sistemas de grupos sanguíneos son conocidas
- Este conocimiento facilita el desarrollo de ensayos para genotipos:
 - **Genotipo fetal, genotipos en pacientes con politransfusiones, genotipos extendidos en donantes**
- Pueden servir de base para asociación de grupos sanguíneos con dolencias, asociación funcional, etc.

Mecanismos moleculares que llevan a diversidad de los antígenos de GS

- Polimorfismo de único nucleótido (SNP): sustitución de un nucleótido por otro
 - Silencioso
 - Missense
 - Nonsense
 - Inserciones y Pérdidas
 - Crossover y recombinaciones
 - Conversión genética
- } entre genes

Mayoría de los antígenos de grupos sanguíneos son resultados de SNPs

- Pares de antígenos codificados por SNPs
- RH C/c, E/e
- MNS S/s
- Kell K/k, Kp^a/Kp^b, Js^a/Js^b
- Duffy Fy^a/Fy^b (GATA)
- Kidd Jk^a/Jk^b
- Lutheran Lu^a/Lu^b
- Dombrock Do^a/Do^b

Polimorfismos de un único nucleotído (SNPs)

- **SNPs** ocurren cada 100-300 bases
- Diferencias de un único nucleotído en una secuencia de ADN entre un individuo y otro
- Consecuencias de las alteraciones de nucleotídos son variables

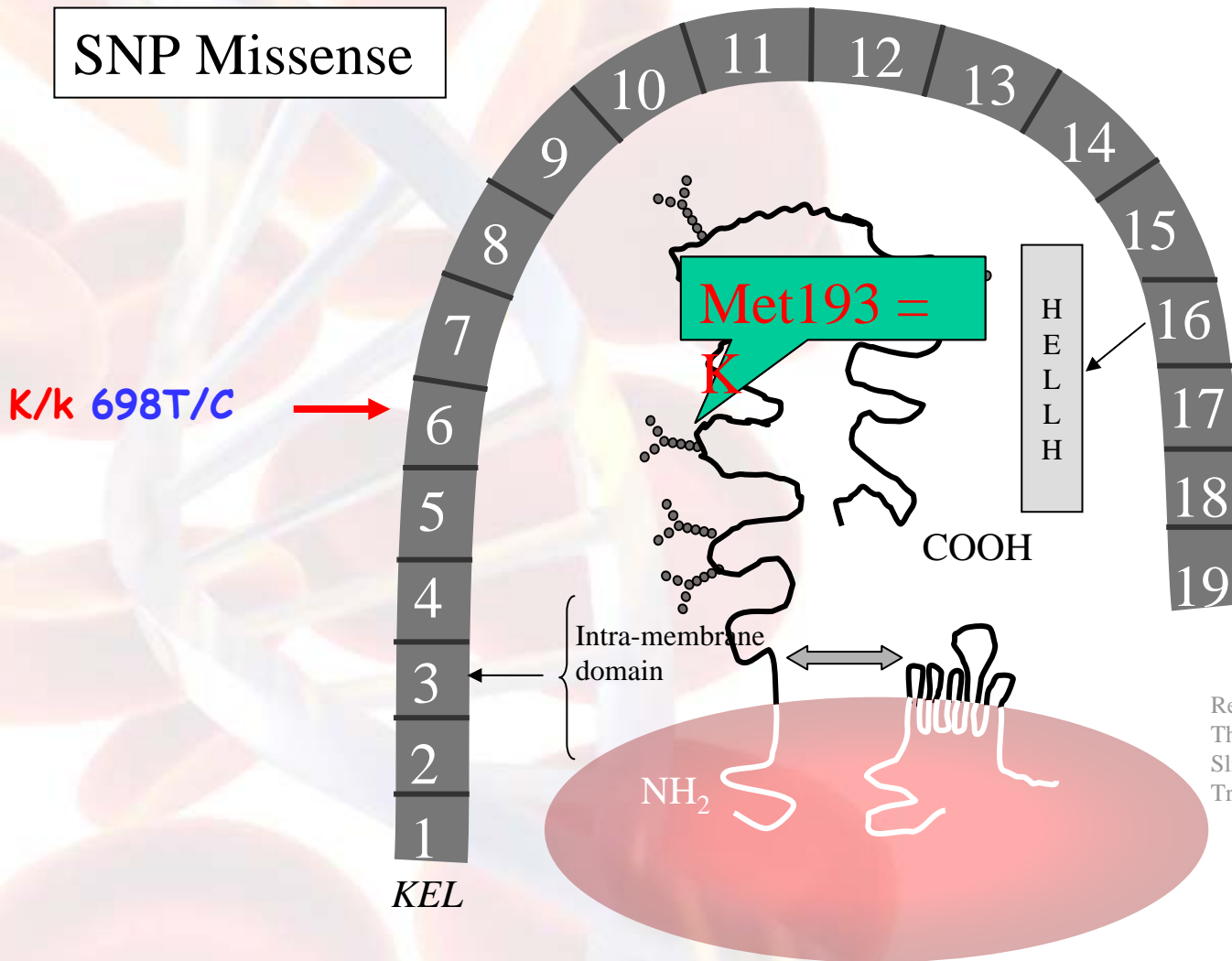
Website:

www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html



SNPS en la región codificadora

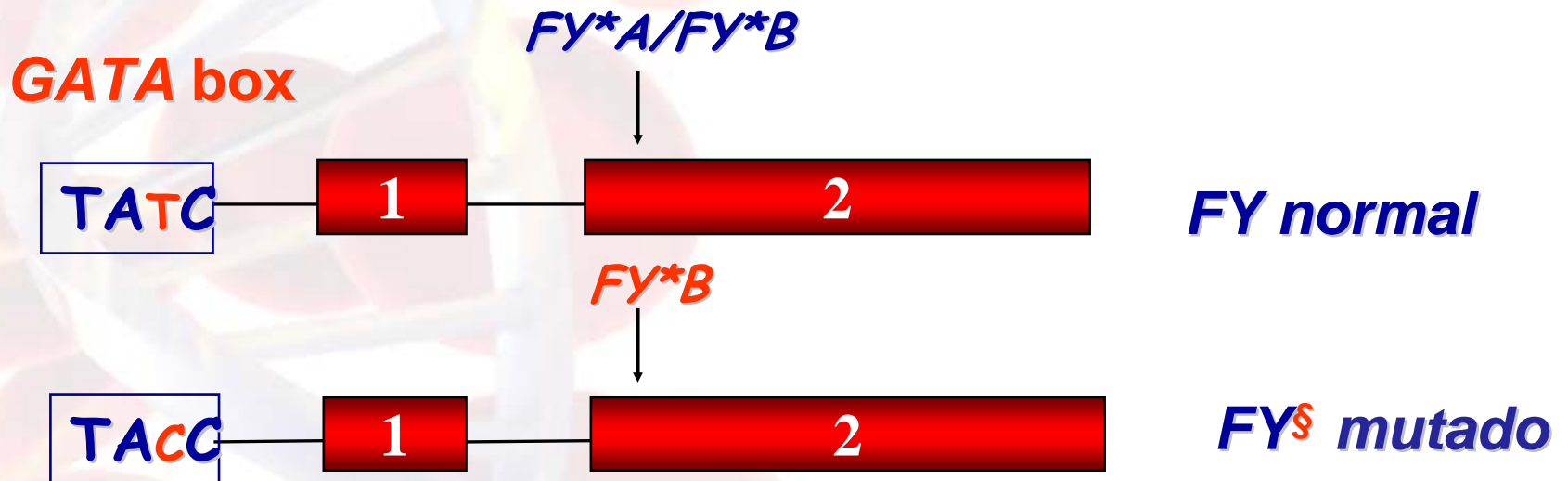
SNP Missense



Reid & Lomas-Francis
The blood group antigen factsbook, 2^o ed.
Slide modified from ES Wester et al.
Transfusion 2005,45:545

SNPs en regiones reguladoras pueden afectar la expresión del antígeno

Mutación T>C en *GATA* box altera la transcripción del gen *FY*

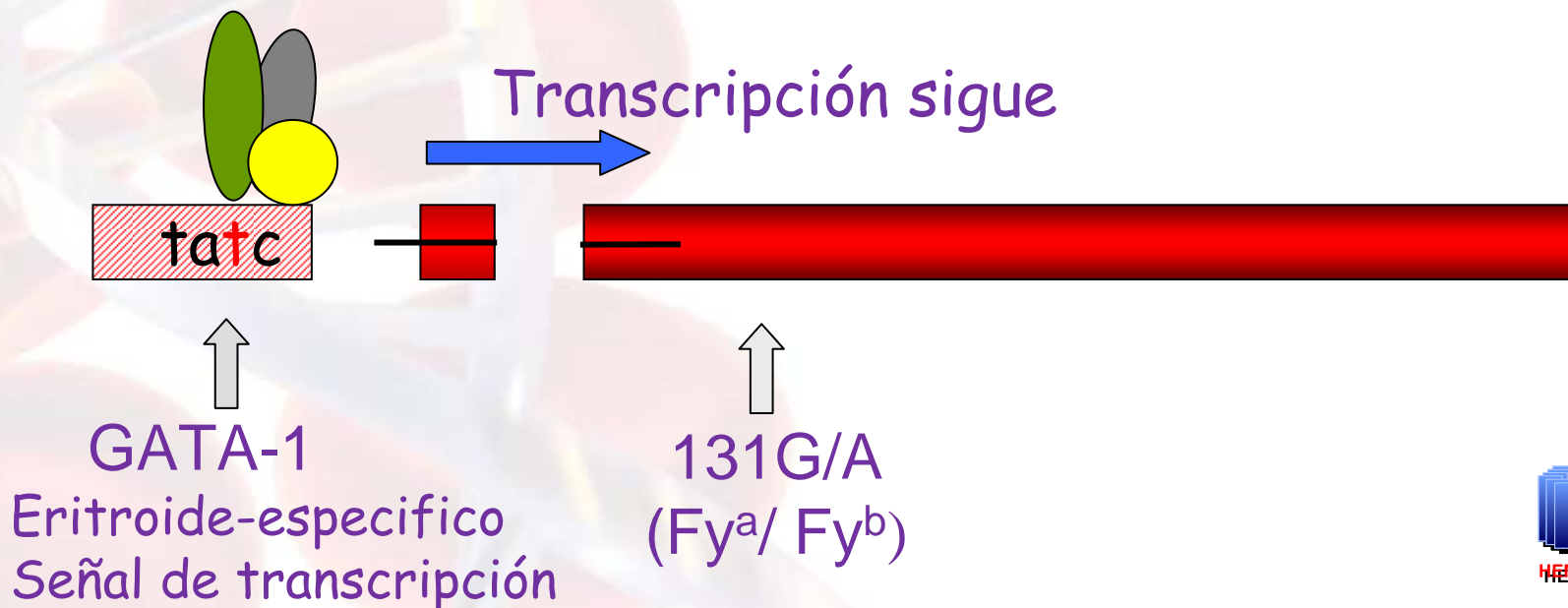


§ En individuos Fy(a-b-) de origen Africano, el gen *FY* codifica *FY*^{*}B

SNPs en regiones reguladoras pueden afectar la expresión del antígeno

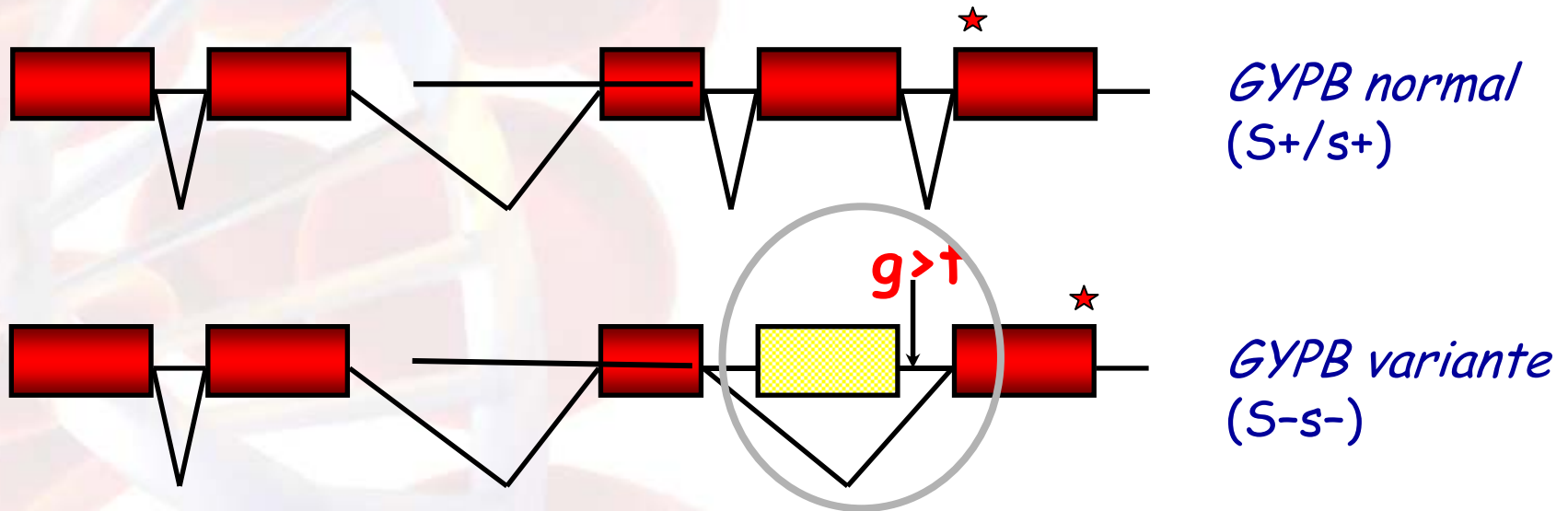
El genoma entero está presente en todas las células nucleadas. La expresión tejido-específica es regulada por señales de transcripción específicos:

Complejo de transcripción reconoce el motivo GATA



SNPs los intrones pueden afectar la expresión del antígeno

Mutaciones en las secuencias conservadas de sitios de splice pueden afectar la expresión del antígeno. Ex. Fenótipo S-s-



Remoción completa del exon 5 del gen *GYPB*:
Ningún antígeno presente en la superficie del hematíe

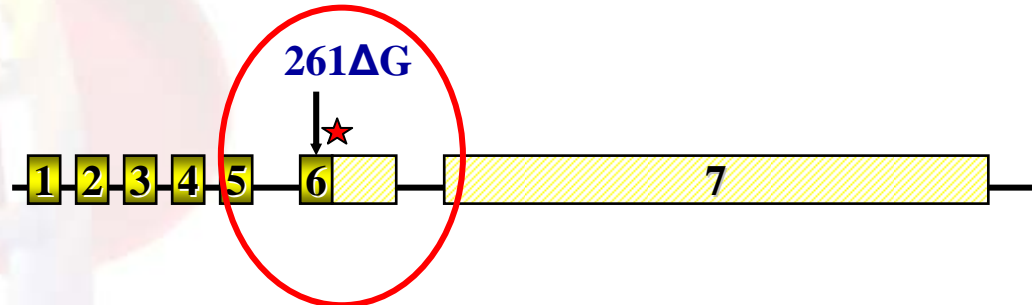
Perdidas de nucleotídeos

- Perdidas de nucleotídeos altera el cuadro de lectura:
- Puede resultar en un stop codon prematuro e.x. Gen O

Alelo A¹



Alelo O¹



Alelo O¹ codifica una proteína inactiva de 117 aminoácidos

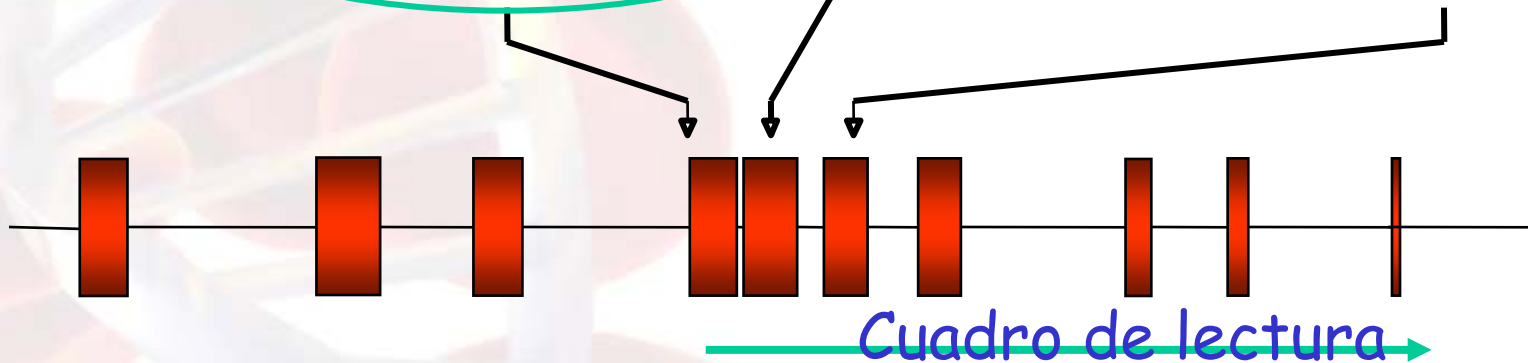
Adición (s) de nucleótidos puede alterar la expresión del antígeno

RHD Ψ

3 mutaciones missenses en el exon 5
M218I, F223V, S225F

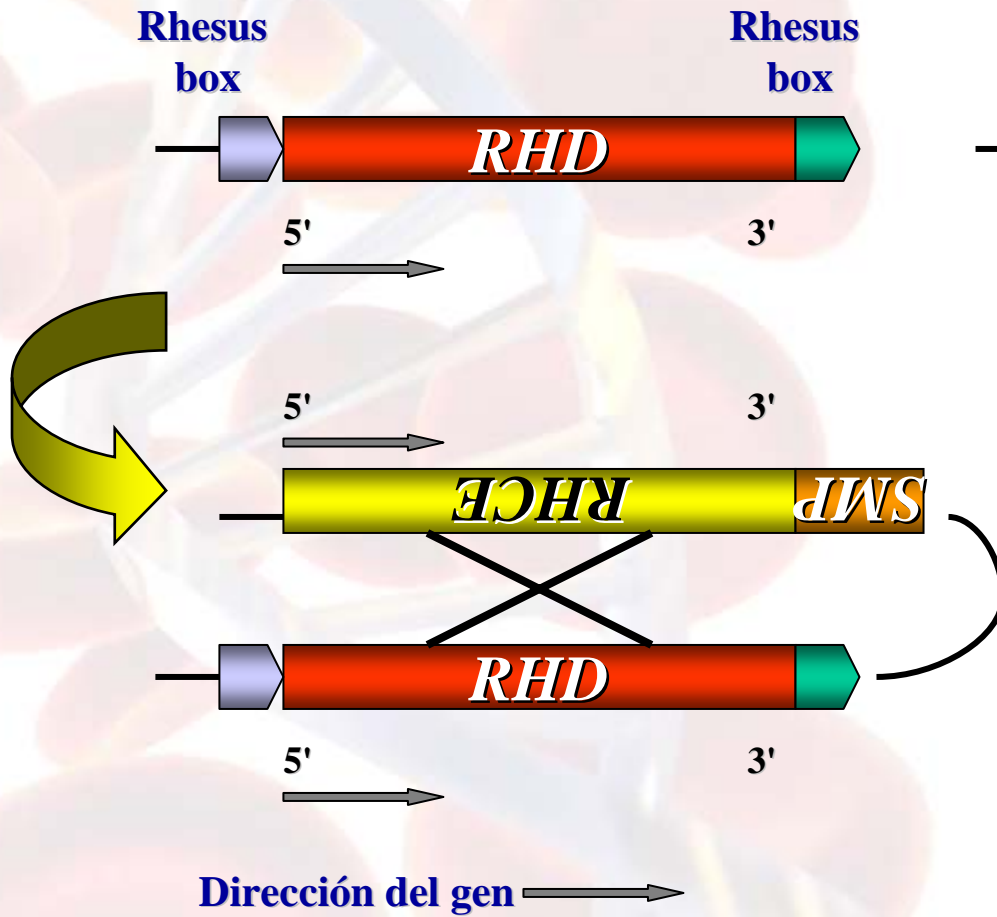
Inserción de 37 bp en la
conjunción intron 3/exon 4

Stop codon prematuro
en nt 269



Ningún transcrito detectado;
Ningún RhD en la superficie de los hematíes

Antígenos son generados por cambios de ADN entre genes similares



Conversión genética

D parcial (D^{IVb} , D^{VI} , DBT)
Fenótipos D- -, Dc-, r's
Antígenos de baja
incidencia

Inmunohematología molecular

- *El especialista de medicina transfusional del futuro tendrá a su disposición... técnicas moleculares para identificar genótipos eritrocitarios*

Jeff McCullough

Transfusion 2003,43:823-28, Editorial

Genotipos!!!

Resultados seguros en las situaciones en que la hemoaglutinación es limitada

Inmunohematología molecular: donde estamos

En donadores de sangre



- Genotipos en larga escala para identificación de antígenos comunes y raros

- Producción

Genotipos *RHD*: *RHD*-
Donadores RhD-!!!

- Proveer sangre a pacientes con aloanticuerpos (ex falciformes)

Inmunoematología molecular: donde estamos



En la medicina transfusional

- Soporte transfusional de pacientes con politransfusiones o aloimmunizados reduciendo o previniendo la aloimmunización
- Soporte transfusional de pacientes con enfermedad hemolítica del recién nacido positivo
- Identificación de pacientes con enfermedad hemolítica del recién nacido

Genotipo *RHD*: *RHD*+ normal
Auto anti-D!!!

Inmunohematología molecular: donde estamos



◆ Paciente con transfusión cada 3 semanas con 2 unidades concentrado de hematíes

◆ Historia de anti-c -E, -K

◆ Prueba de

◆ S

Paciente JK(a+): Auto anti-Jk^a!!!

1 en 6 unidades son c-, E-, K-

1 en 25 unidades son c-, E-, K-, Jk(a-)

◆ Servicio

para transfusión y q

genotipo

Jk(a-)

Inmunohematología molecular: donde estamos



- ◆ Paciente con fenotipo
- ◆ 1 en 10 unidades son R_1R_2 K-Jk(a-)
- ◆ 1 en 500 unidades son R_2R_2 K-Jk(a-)
- ◆ Muestra encaminada para el genotipo

Fenotipos por Genotipos en pacientes falciformes con politransfusiones

15 / 50 (30%) las muestras de ADN de los pacientes con politransfusiones estudiados representan discrepancias

Riesgo de reacción de transfusión hemolítica

ADN de
sangre periférica

ADN de
epitelio bucal

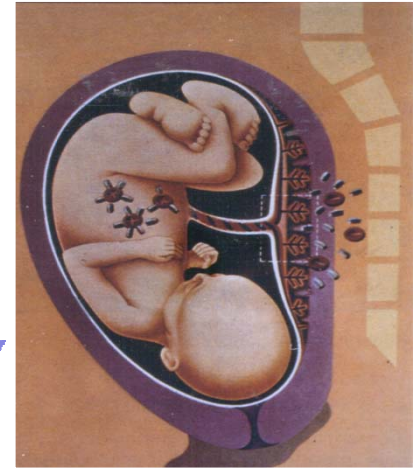
Inmunohematología molecular: donde estamos

En la medicina materno-fetal

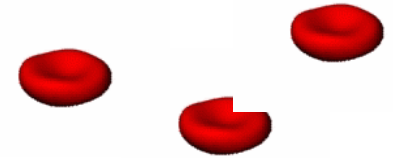
- Genotipos materno
- Genotipos paterno
- Genotipos fetales

Genotipo fetal en el plasma
materno: *RHD+*

Profilaxia Rh indicada



Inmunohematología molecular: donde estamos



En el control de calidad de reagentes de hematíes

Fenótipo

A

D

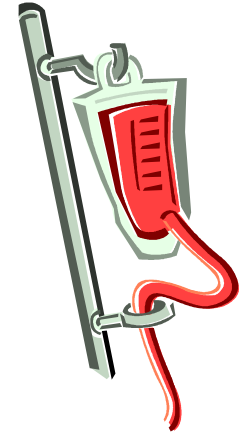
F

5 de 59 (8.5%) de hematíes

De los paneles eran heterocigotes para

*FY*A* ou *FY*B*

Inmunohematología molecular: donde estamos



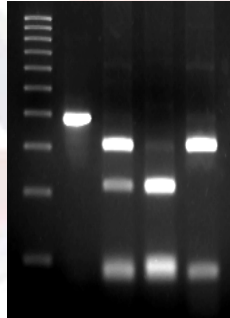
Otras áreas

- Determinación del origen de los leucócitos transplantados en receptores de células hematopoyéticas
- Determinación del origen de los linfócitos en pacientes con GVHD

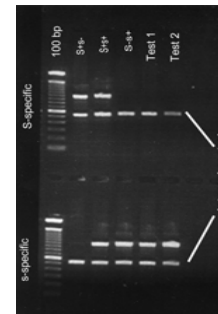
Inmunohematología molecular: donde estamos

Técnicas actualmente empleadas ("in house")

➤ PCR-RFLP



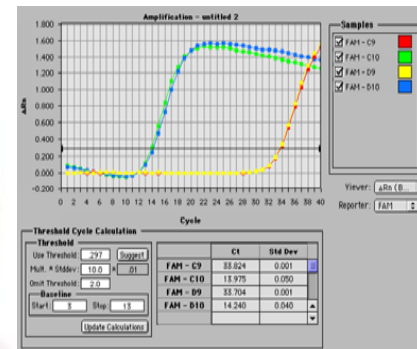
➤ PCR Alo específico AS-PCR)



➤ PCR Multiplex



➤ PCR en tiempo real



Inmunohematología molecular: donde estamos

Técnicas atualmente empregadas

➤ **AS-PCR, PCR-SSP e PCR-RFLP**

- trabajo manual
- análisis por electroforesis (gel de agarose, poliacrilamida)
- repeticiones
- diferentes ensayos para la misma muestra

➤ **PCR Real-Time**

- análisis en tubo cerrado
- trabajo manual

➤ **Microarray (DNA arrays-chip)**

- automatización
- numerosos polimorfismos (único ensayo para la misma muestra)
- download directo de las interpretaciones para la base de datos



Inmunohematología molecular: donde estamos

Técnicas actualmente empleadas: microarray

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

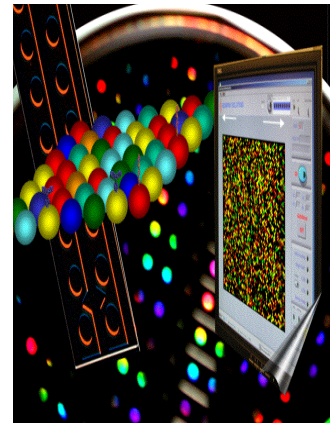
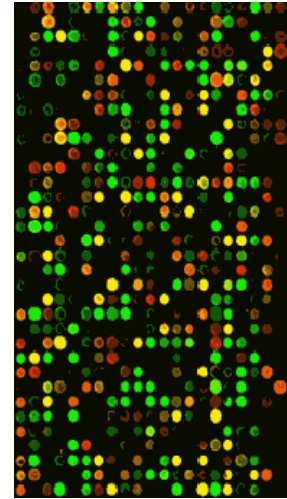
Sigrid H.W. Beiboer, Tinka Wieringa-Jelsma, Petra A. Maaskant-Van Wijk, C. Ellen van der Schoot, Rob van Zwieten, Dirk Roos, Johan T. den Dunnen, and Masja de Haas

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

G.A. Denomme and M. Van Oene

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

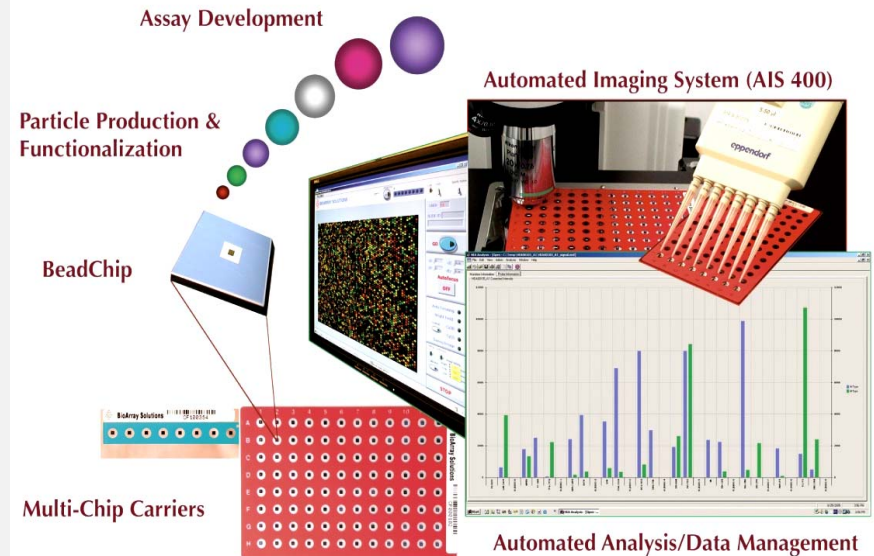
Ghazala Hashmi, Tasmia Shariff, Michael Seul, Prabhakar Vissavajhala, Kim Hue-Roye, Dalisay Charles-Pierre, Christine Lomas-Francis, Asok Chaudhuri, and Marion E. Reid





DNA array -BeadChip™

- Genotipos para: **C/c, E/e, Kk, MNSs, Jk^a /Jk^b, Fy^a/Fy^b, Di^a/Di^b, Co^a/Co^b, Lw^a/Lw^b, Sc1/Sc2, Lu^a/Lu^b, Do^a/Do^b, Hy, Jo^a,**
- **Hgb S**
- **Chip RHD**
- **Chip RHCE**
- **Costo es competitivo**



Fuentes de ADN que pueden ser utilizadas para genotipos

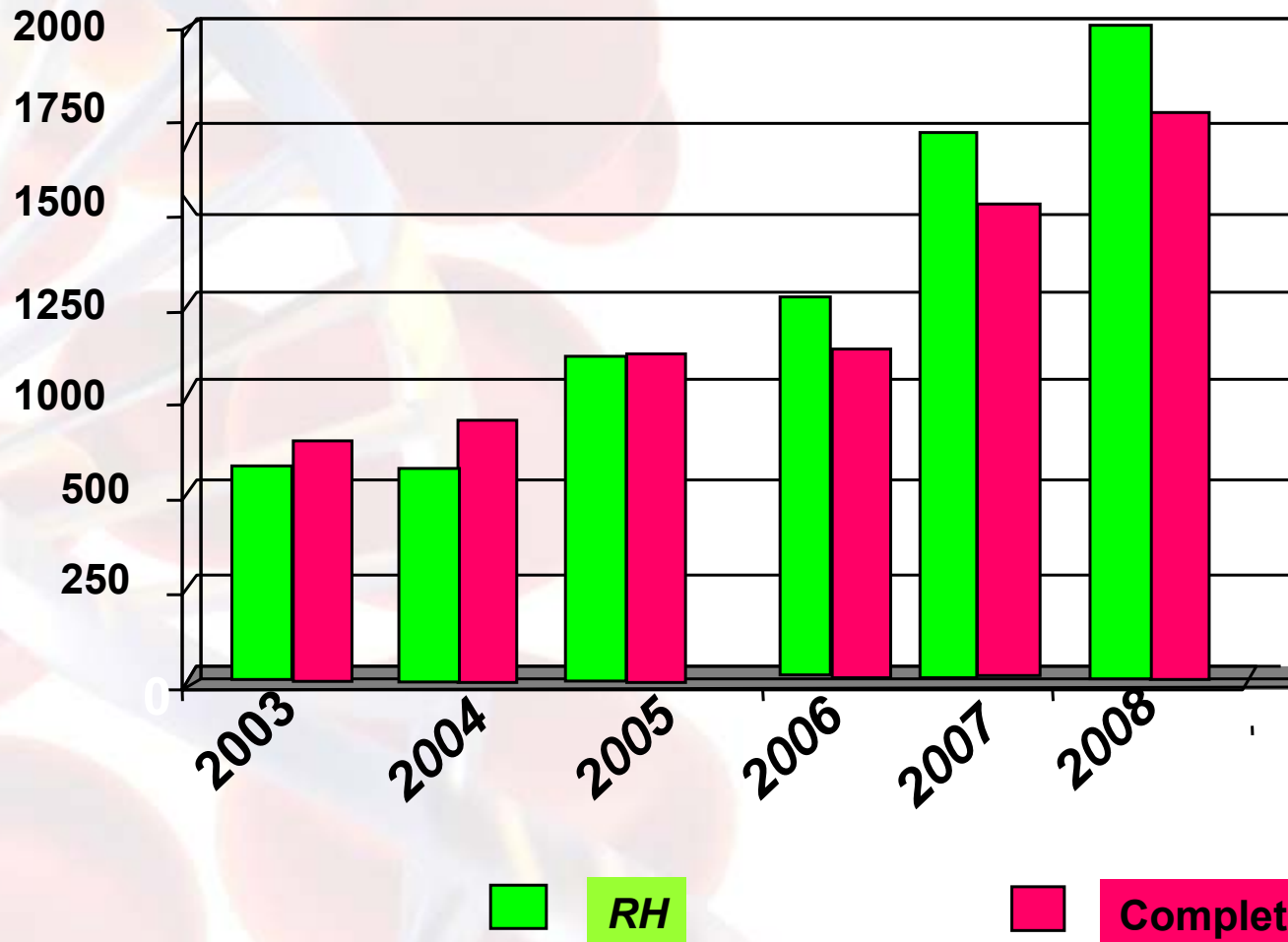
- Sangre (Leucócitos)
- Células del epitelio bucal
- Orina (células en el sedimento urinario)
- Líquido amniótico (amniócitos)
- ADN fetal en plasma materno

Limitaciones

- La eficiencia de amplificación del PCR es influenciada por la cantidad y calidad del ADN
- Algunos ajustes en la técnica de PCR o en el preparo de la muestra son necesarios

Inmunohematología molecular: donde estamos

Integrando los test moleculares a los test serológicos en la rutina transfuncional





SOLICITACIONES DE GENOTIPOS EN LA CLÍNICA 2003-2008

➤ Total de pedidos: 1261

512 *RH*D (D fraco e D parcial)*, 158 *RH*C/c*, 158 *RH*E/e*, 137 *KEL*1/2*, 125 *FY*A/B*, 111 *JK*A/B*, 60 *GYPB*S/s*

➤ Total de pacientes: 298

201/298 con transfusiones recientes

45 portadores de auto ac

32 discrepancias de tipo Rh

➤ Total de donadores: 172

112/172 genotipo *RHD (D debil y D parcial)*



RESULTADOS DE GENOTIPOS EN LA CLÍNICA 2003-2008

➤ Total de pacientes: 298

- 138/161 muestra el “fenótipo probable” fue confirmado. Alteraciones en la conducta transfuncional fueron realizadas en 23 pacientes
- Distinciones entre alo y auto anti-D, anti-C, anti-e fueron hechas de acuerdo con los resultados de genotipo en 7 muestras
- En 28 pacientes con AHAI el genotipo auxilio en la deducción del perfil antigénico (Rh, Kell, FY, JK, Ss) y en la identificación de aloanticuerpos
- En 32 muestras fueron resueltas discrepancias Rh. Hubo alteración de la conducta transfuncional en 12 pacientes (D parcial al revés de D débil)
- 68 pacientes fueron genotipados como *FYB-33* y pudieron recibir sangre Fy(b+)



RESULTADOS DE GENOTIPOS EN LA CLÍNICA 2003-2008

➤ Total de donantes: 172

- 82/112 muestras confirmadas como D debíl
- Distinciones entre D debil y D parcial fueron hechas en 17 muestras
- En 42 muestras fueron resueltas discrepancias RhD. 3 donadores fenotipados como RhD-negativo fueron genotipados como D debil y 1 como Del
- 3 muestras fueron confirmadas como *FYX*
- 2 muestras fueron identificadas como S-s-
-

Evaluación para la implementación del genotipo para uso clínico

- Muestras de sangre fenotipos deben ser analizadas por PCR en estudio ciego para la evaluación del método
- El número de muestras usadas en evaluación de un test debe ser grande y suficiente para incluir el máximo de variantes genéticas presentes en la población para la cual el test va ser usado
 - Población Europea Vs Población Peruana
- Revalidación del test con nuevas variantes
- Participación en test de proeficiencia

Genotipos para uso clínico

Evitando contaminación

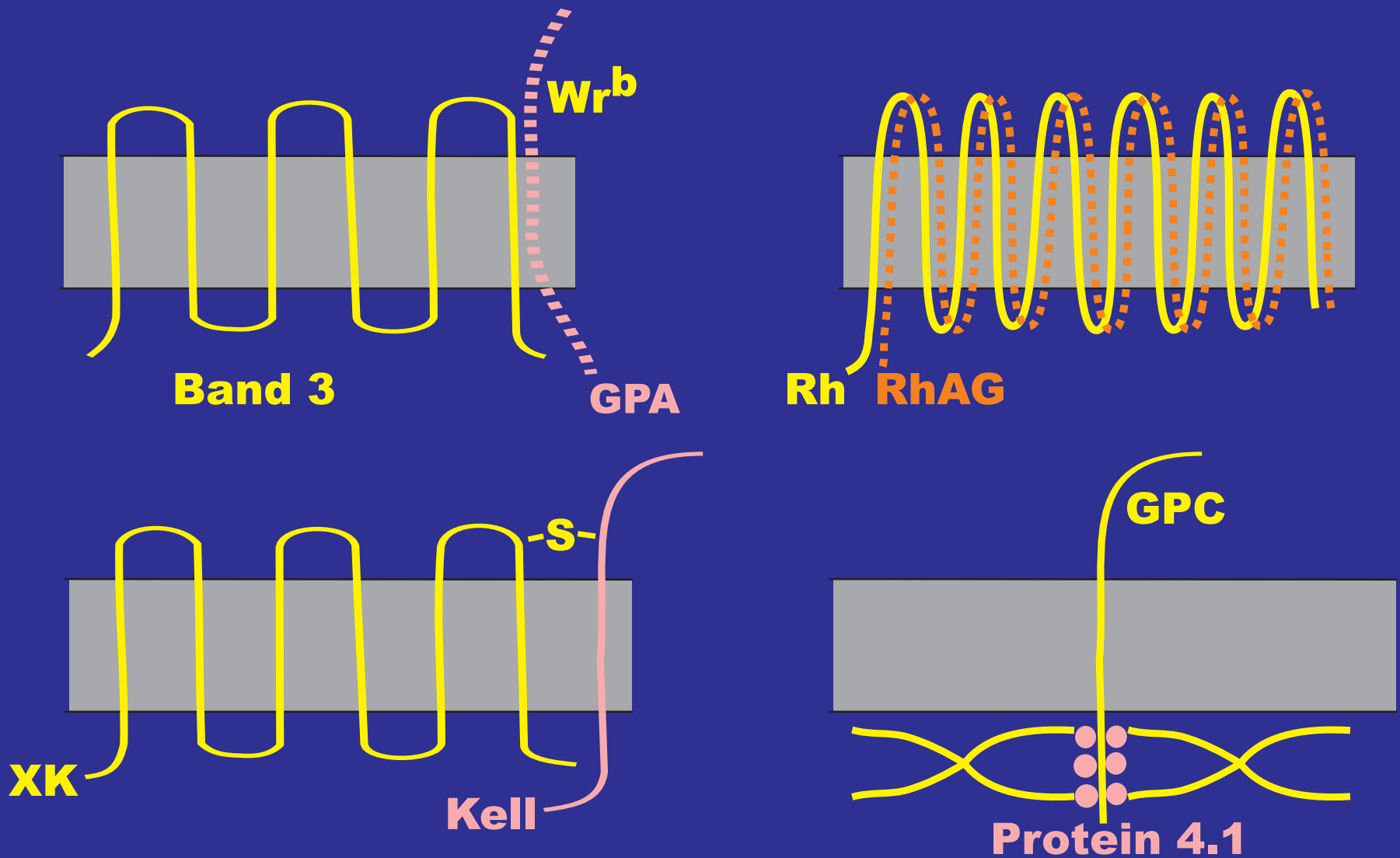
- Ocurrencia de contaminación con muestras previamente analizadas
- El PCR debe ser optimizado para detectar secuencias de ADN del paciente (comparar muestras de sangre con otras fuentes de ADN)

Situaciones en que el genótipo y el fenótipo pueden no corresponder

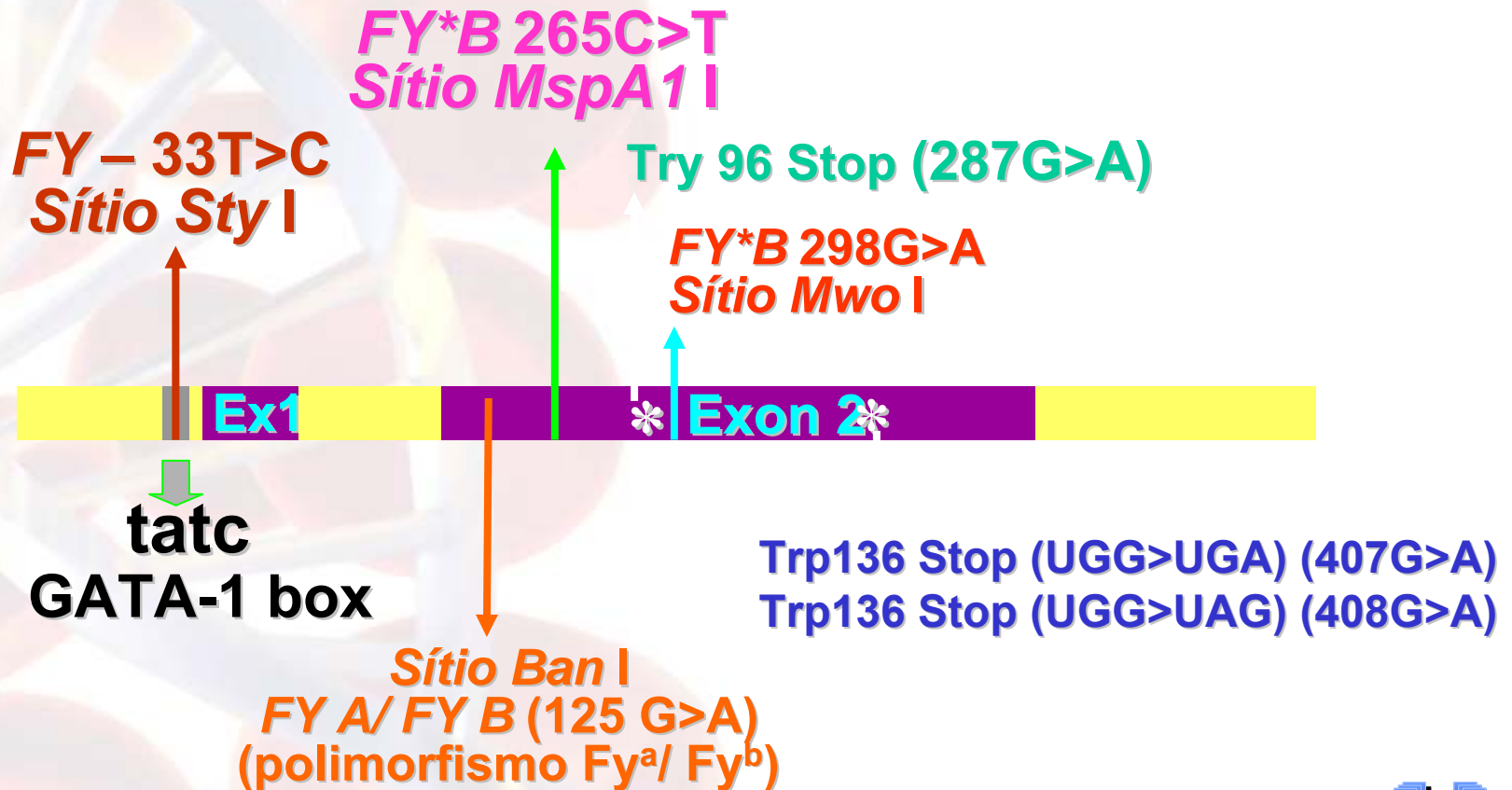
- Transfusiones crónicas/masivas
- Alteración en el gen afectado: transcripción (Fyb-); splicing (S-s-); introducción de stop codon (Fy(a-b-), Rh_{null}), o mutación que afecta la estabilidad de la proteína en la membrana de la célula (Fy^x)
- Crossing overs y otros arreglos genéticos (*RHD/RHCE*)
- Alteración en otro gen que está asociado con la expresión del gen : *RHAG* → Rh_{null}

Interacción de proteínas en la membrana del hematíe

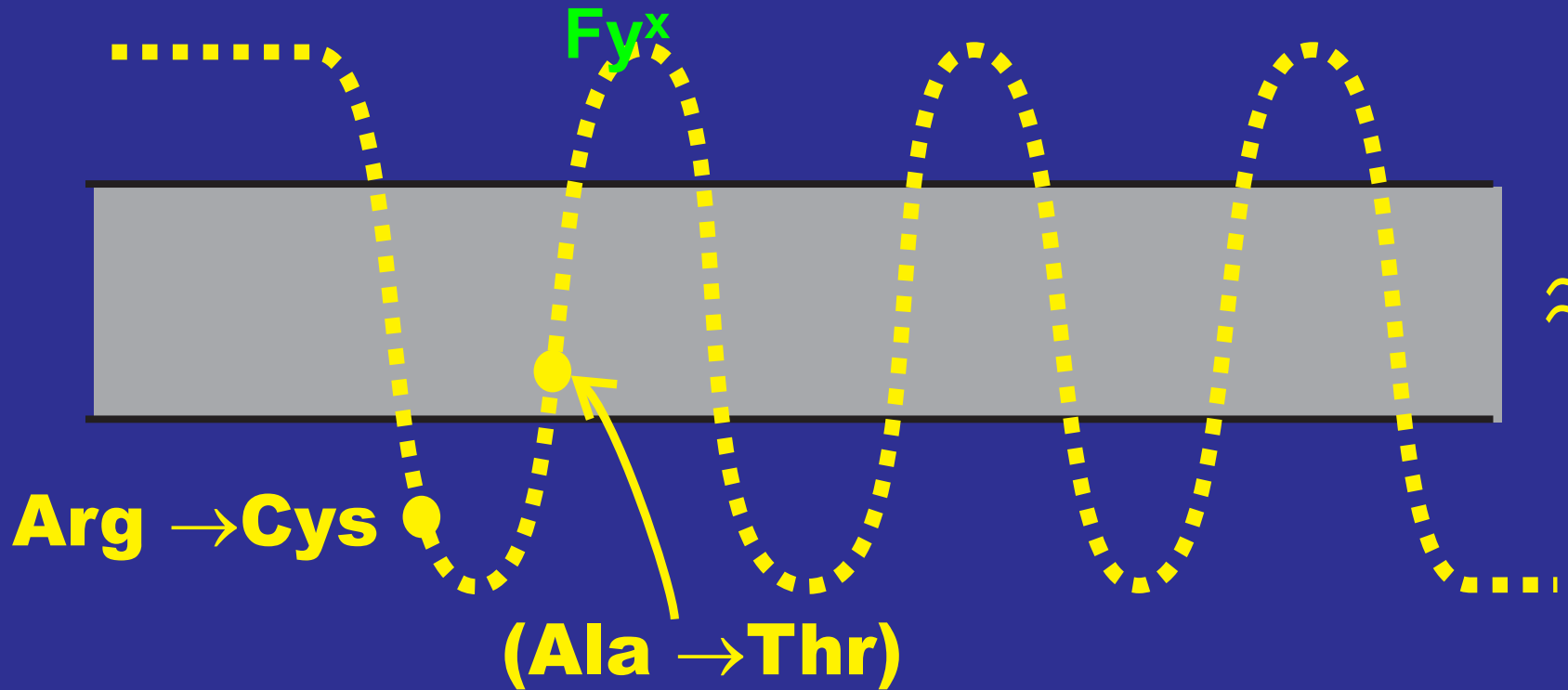
Interaction of Proteins in RBC Membrane



Gene Duffy



Substitución de aa llevando a la reducción de expresión de proteína en la membrana



Proteína es reducida aproximadamente 10%

Genotipos: Cuidados

- Un genotipo no es un fenotipo
- Muchos a los por fenotipo
- ADN de células somáticas y de sangre periférico pueden no concordar (transplantes)
- No todos los SNPs pueden ser analizados

Genotipos para uso clínico

Importante: Fenotipo es deducido del genotipo

Genotipos de grupos sanguíneos en clínica requieren:

- Conocimiento en grupos sanguíneos
- Experiencia en la interpretación de las reacciones de PCR utilizadas
- Obtención de hallazgos serológicos y de la historia clínica del paciente antes de interpretar los resultados del genotipo
- Conocimiento de los genes que codifican los antígenos de GS y sus formas variantes (fenótipos y genótipos pueden no relacionarse) en la población estudiada

Inmunohematología molecular: donde estamos

CBGG: Estructura



Marion Reid
Coordinadora

Miembros

Lilian Castilho
America Latina

Greg Denomme
Canada

Connie Westhoff
USA

CBGG: Objetivos

- Establecer un banco de ADN
- Implementar un programa de proeficiencia
- Empadronar pedidos de exámenes, planillas de trabajo y laudos
- Desarrollar empadronamientos técnicos
- Promover a la interacción entre los laboratorios de Inmunohematología molecular de las Américas

Inmunohematología molecular: donde estamos

Molecular Testing Standards Program Unit

Committee Members

Joann M. Moulds, PhD, MT(ASCP)SBB, Chair
Lilian Castilho, PhD
Ghazala Hashmi, PhD
Susan T. Johnson, MSTM, MT(ASCP)SBB
Benjamin Lichtiger, MD, PhD
Terry Perlin, PhD
Gayle Teramura, BS
Connie M. Westhoff, PhD, MT(ASCP)SBB

Liaisons Representing Other AABB Committees

Immunohematology Reference Laboratories Standards Program Unit—
Dawn Michelle, MT(ASCP)SBB
Relationship Testing Standards Program Unit—George Maha, JD, PhD, MT(ASCP)

Representatives from Other Organizations

American Red Cross—Sandra J. Nance, MS, MT(ASCP)SBB
American Society for Histocompatibility and Immunogenetics—James Mason, PhD
Consortium for Blood Group Genes—Marion E. Reid, PhD, FIBMS

Consultant

Jill R. Storry, PhD, FIBMS

Standards

for
Molecular Testing
for Red Cell,
Platelet, and
Neutrophil Antigens

1st Edition

aabb

Inmunohematología molecular: para donde vamos

Tecnología Microarray: potencial para cambiar a la práctica en la medicina de transfusión

El fin de la serología está próximo?

EDITORIAL

Volume 45, May 2005 TRANSFUSION 653

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

- Un fenótipo puede tener múltiples genótipos,
- especialmente fenótipos null, ABO y Rh
- Inpracticable ensayo para todos los alo
- ADN no es el método para escoger para los
- tipos ABO e Rh

➤ Las cosas no siempre son como aparentan ser: similar a la aglutinación, test moleculares también tiene limitaciones

- Pérdida de experiencia serológica (expertise)
- Costo?



Inmunohematología molecular: para donde vamos

- Programas para tener genotipos en pacientes con un esquema de transfusiones: falciformes y talasemicos
- Genotipo fetal en el plasma materno
- Tipos y confirmación de los antígenos de grupos sanguíneos en los hematíes de donadores de sangre:
 - Programas de screening para aumentar stocks de sangre con fenotipos

Inmunohematología molecular: para donde vamos

Un nuevo paradigma en la medicina de transfusión

- Genotipos es un método seguro y puede ser aplicado para la determinación de grupos sanguíneos
- Plataformas con múltiples test pueden ser utilizadas para investigaciones y diagnóstico
- Genotipos en larga escala pueden traer beneficios para el donador y paciente si es **adecuadamente aplicada**

Inmunohematología molecular: para donde vamos



Utilice una base de datos para los pacientes y donadores que pueda ser disponible para todos los bancos de sangre

- Prevenga la aloimmunización
- Evite reacciones hemolíticas
- Haga transfusiones seguras

Blood-Matching Goes Genetic

Hoping to prevent adverse transfusion reactions and save lives, European researchers are lobbying to replace serology-based blood typing with matching based on DNA tests

14 MARCH 2008 VOL 319 SCIENCE

www.sciencemag.org

Gracias por la atención!

