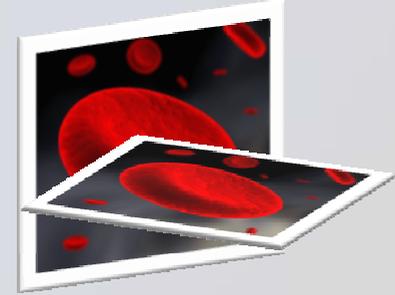


# Simbiosis entre la serología y métodos moleculares en Inmunohematología



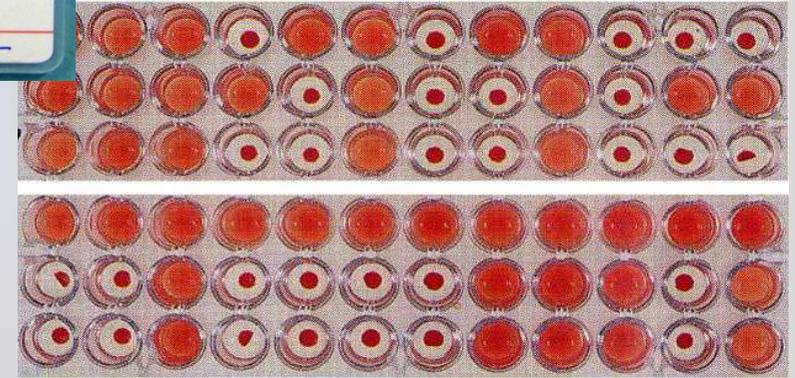
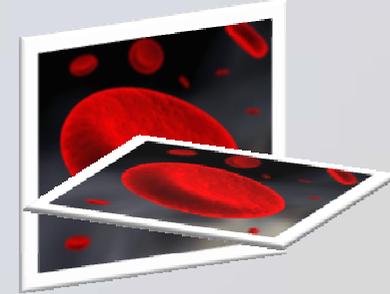
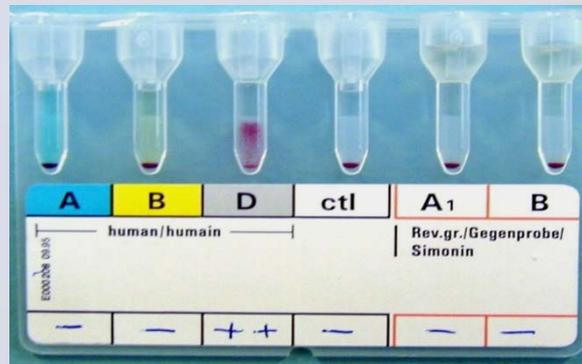
*Lilian Castilho, PhD*



# ***Definición***

## **Simbiosis**

- **Interacción biológica entre 2 diferentes organismos viviendo en asociación física con ventajas para ambos**



## *Hemaglutinación*

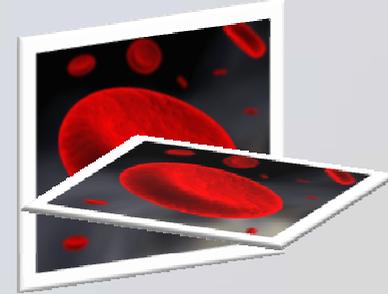
- Mistura de hematíes lavadas con anticuerpos anti-eritrocitarios específicos (monoclonal o policlonal) **Algunas especificidades no disponibles o limitadas**
- Teste con mas de 100 años (Karl Landsteiner 1901, Nobel Laureate)
- La rutina de serología de grupos sanguíneos es dirigida para la detección de los antígenos de grupos sanguíneos clínicamente significantes: **ABO, RH, KEL, FY, JK e MNS**
- **Alloinmunización detectada por la PAI y compatibilidad entre receptor y donante**

Esa metodología posibilitó el desarrollo y la práctica de la medicina transfusional durante el siglo XX

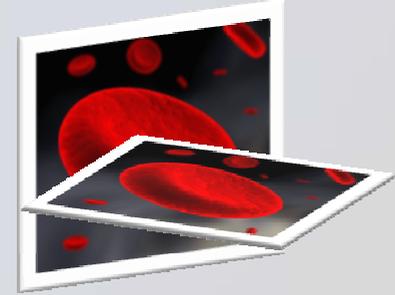
# *Hemaglutinación*

## Limitaciones

- **Falta de reactivos policlonales y monoclonales:**
  - **Dificultades en la fenotipage de donantes y pacientes**
  - **Caracterización de los reactivos de hematíes utilizados para detección y identificación de anticuerpos**
- **Variabilidad de reactividad de los anticuerpos monoclonales cuando comparados con los policlonales**
- **Baja reactividad de los anticuerpos clínicamente significantes**
- **Falta de un método único (universal) para la detección y identificación de anticuerpos**
- **Subjetividad en la realización, lectura y interpretación de los resultados**



# *Hemaglutinación*



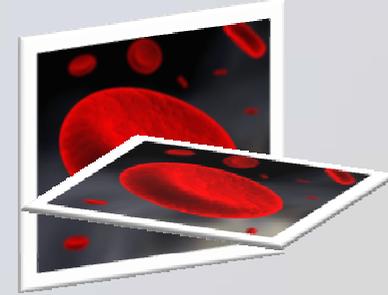
## Limitaciones

### ➤ Dificultades en la:

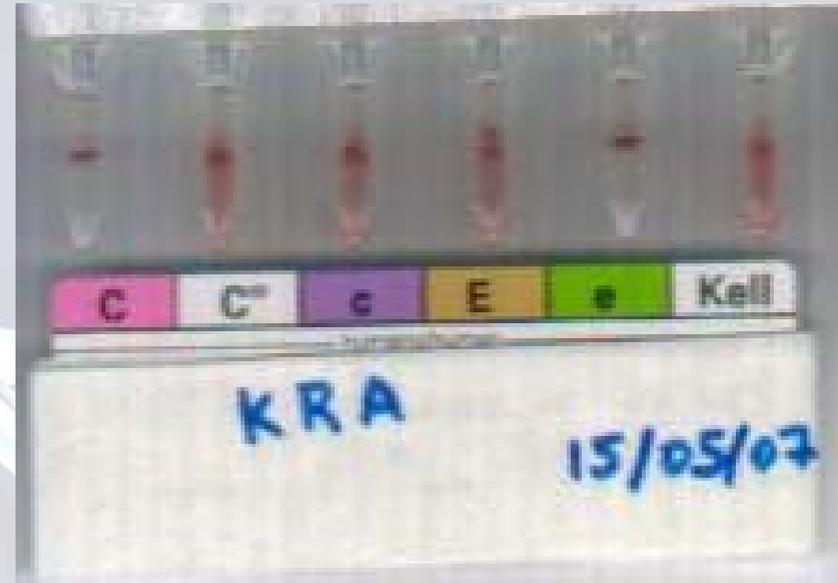
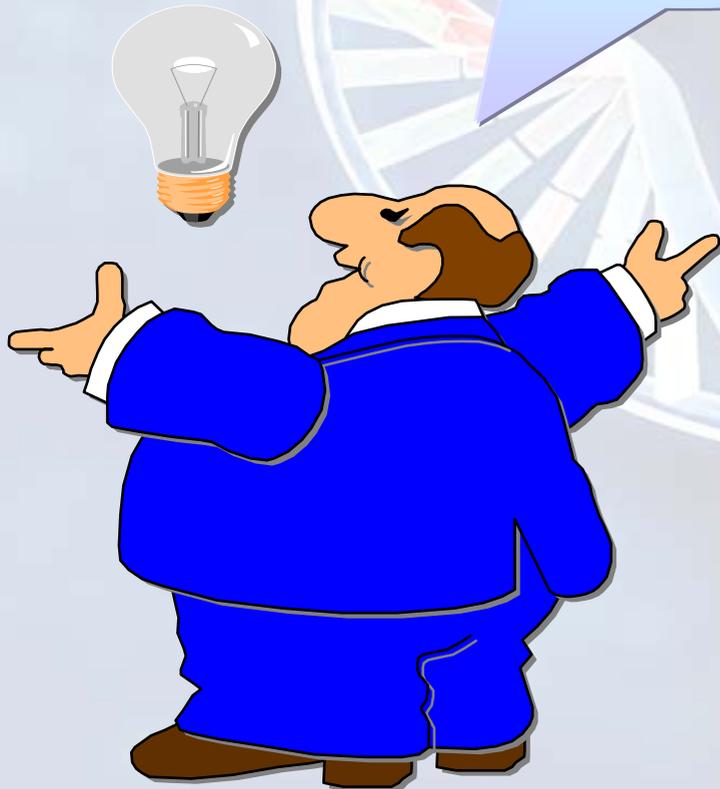
- fenotipage de pacientes poli transfundidos
- fenotipage de hematíes recubiertas con IgG
- identificación de ags variantes
- identificación de ags de baja y alta frecuencia

# Hemaglutinación

Limitaciones

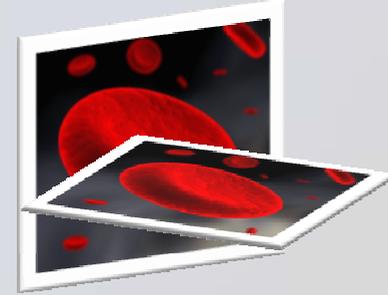


Que hacer!

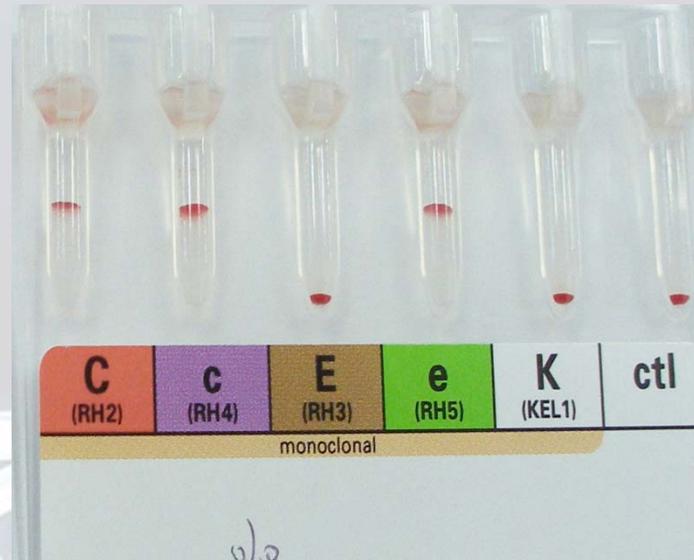
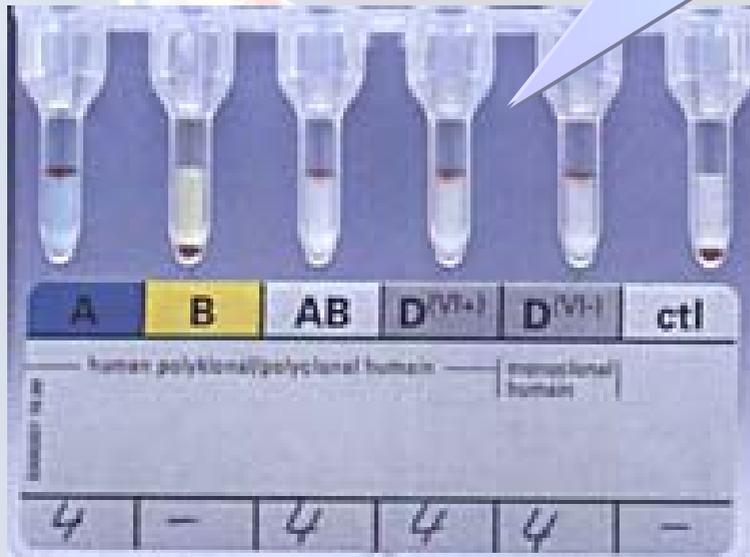


# Hemaglutinación

Limitaciones



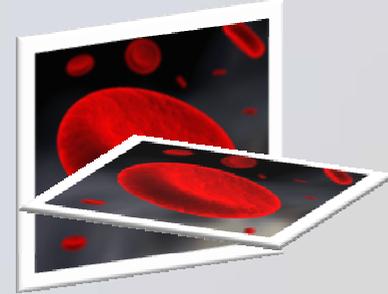
D homocigoto o heterocigoto?



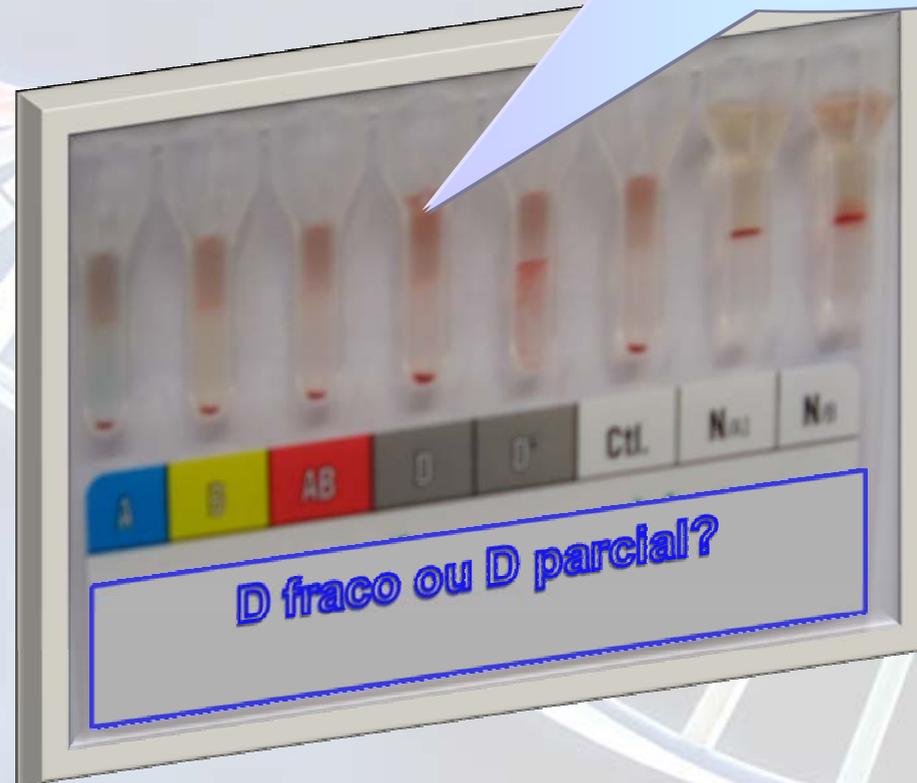
A R<sub>1</sub>r ou R<sub>1</sub>R<sub>0</sub>?

# Hemaglutinación

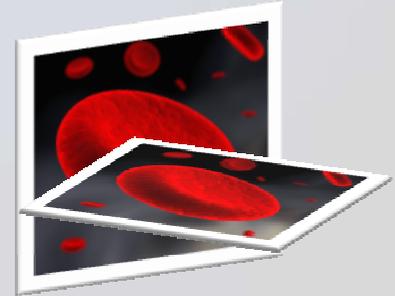
Limitaciones



D débil o  
D parcial?



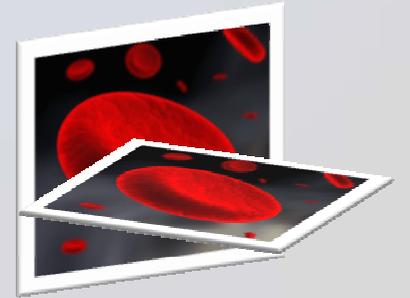
# *Hemaglutinación*



## Limitaciones: Reactivos de hematíes

- Dificultad en la inclusión de células homocigotas para los ags D, C, c, E, e, Fy<sup>a</sup>, Jk<sup>a</sup>, S y ags de baja incidencia en los reactivos para escrutinio
- Limitación en la inclusión y exclusión de aloanticuerpos debido a fallas en los paneles de hematíes
- Control de calidad de reactivos de hematíes (determinación de la zigocidad para D, Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>)

# *Fenotipage de grupos sanguíneos*



## Limitaciones

- **Testes y inclusión de datos son trabajosos**
- **Números de donantes que podemos fenotipar**
  - **Proveer sangre antígeno-negativo para pacientes con el anticuerpo correspondiente**
  - **Proveer sangre fenotipo compatible para los pacientes poli transfundidos (ex: falciformes)**

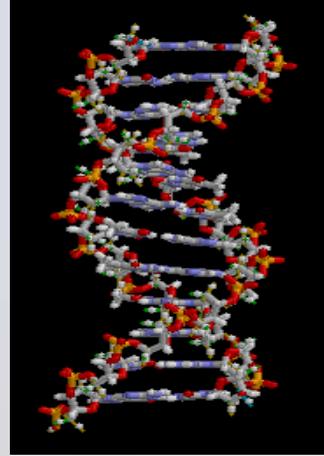


*El especialista de medicina transfusional del futuro tendrá a su disposición... técnicas moleculares para identificar genotipos eritrocitarios*

*Jeff McCullough*

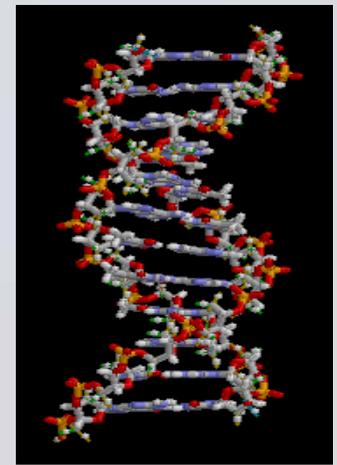
*Transfusion 2003,43:823-28, Editorial*

# ***Antígenos de grupos sanguíneos: productos de genes***



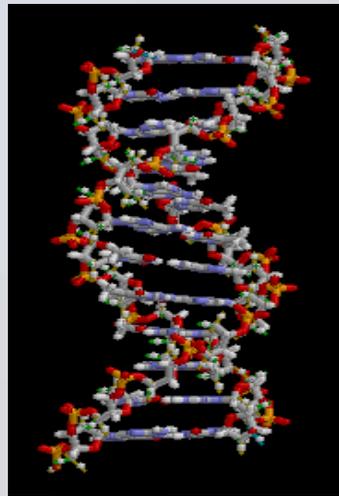
- **antígenos cargados en proteínas son codificados directamente por los genes**
- **antígenos carbohidratos son controlados por genes que codifican glicosiltransferases**
- **polimorfismos de GS definidos al nivel genético**
- **análisis molecular de los genes de GS puede ser útil en la clínica**

# ***Aplicaciones de los testes moleculares en donantes de sangre***



- **Genotipage en larga escala para identificación de antígenos comunes y raros**
- **Producción de paneles de hematías complementares**
- **Zigocidad D, Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup> : control de calidad de reactivos**
- **Determinación de variantes Rh (D debil, Del, e<sup>var</sup> )**
- **Proveer sangre antígeno-negativo para pacientes con aloanticuerpos (ex falciformes)**

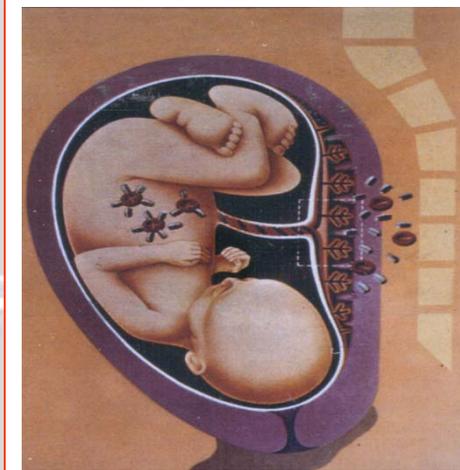
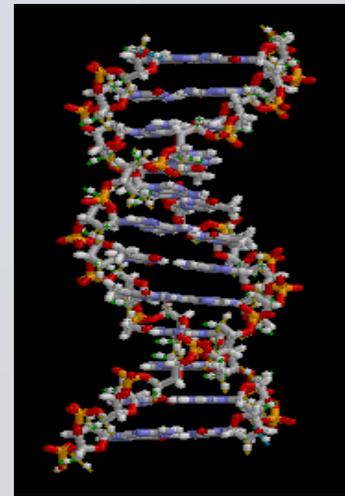
# ***Aplicaciones de los testes moleculares en la medicina transfusional***

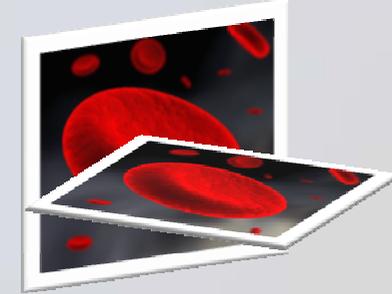


- Soporte transfusional de pacientes politransfundidos o aloinmunizados reduciendo o previniendo la aloinmunización
- Soporte transfusional de pacientes con teste directo da AGH positivo
- Identificación de fenotipos raros
- Identificación de variantes Rh que presentan riesgo de aloinmunización
- Confirmación del genotipo cuando un antígeno es débilmente expresado
- Resolución de discrepancias ABO, RhD

# ***Aplicaciones de los testes moleculares en la medicina materno-fetal***

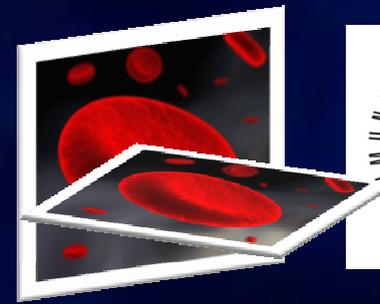
- **La madre tiene un anticuerpo IgG clínicamente significativo**
- **El Padre es heterocigoto para el gene que codifica o antígeno de interese, o desconocido**
- **Genotipage fetal (plasma materno)**





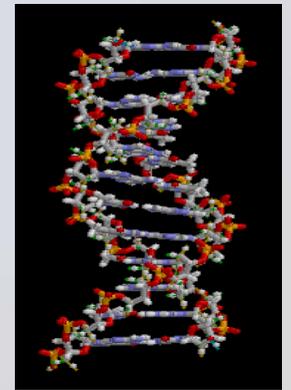
# ***Aplicaciones de los testes moleculares en el control de calidad de reactivos de hematíes***

<b>Fenotipo</b>	<b>Probable Genotipo</b>
<b>A</b>	<b>AA, AO</b>
<b>D+</b>	<b>RHD/RHD or RHD/–</b>
<b>Fy(a+b–)</b>	<b>FY*A/FY*A or FY*A/FY or FY*A/FY*X</b>
<b>Fy(a–b+)</b>	<b>FY*B/FY*B or FY*B/FY or FY*B/FY*X</b>



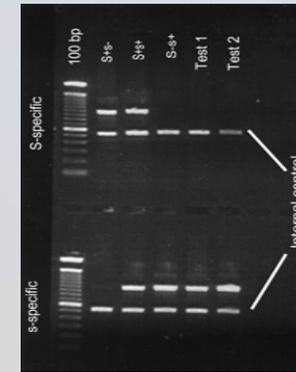
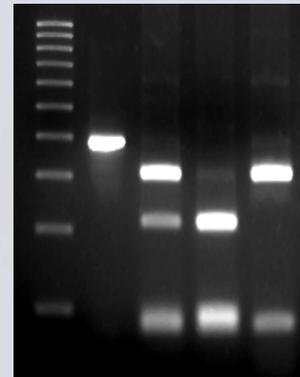
*Testes moleculares utilizados  
en la determinación de alelos  
de grupos sanguíneos*

# Testes moleculares para la análise de genes de grupos sanguíneos



## ➤ Amplificación del DNA por PCR

- PCR-RFLP
- PCR-alelo-especifico
- PCR-multiplex

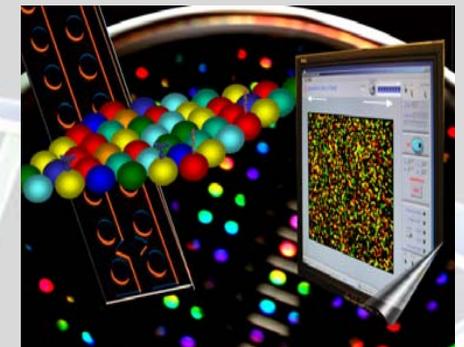
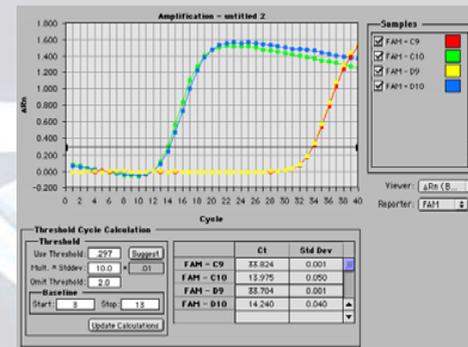
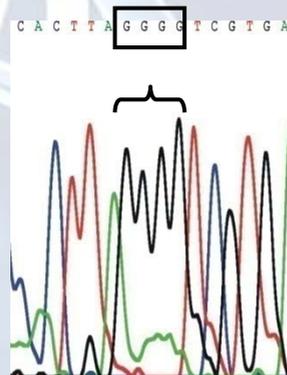


## ➤ Clonaje y secuenciamiento

## ➤ Real time PCR

## ➤ Métodos automáticos

## ➤ Microarray



# *Genotipage de grupos sanguíneos*

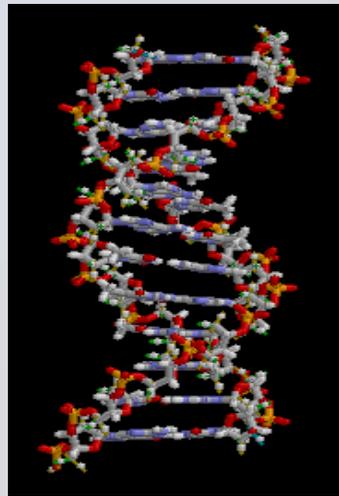
**Técnicas actualmente empleadas son  
trabajosas y demoradas**

## ➤ **AS-PCR y PCR-RFLP requieren**

- **trabajo manual**
- **análisis por electroforesis (gel de agarosa, poliacrilamida)**
- **Repeticiones**
- **Diferentes ensayos para la misma muestra**

## ➤ **PCR Real-Time fornece análisis en un tubo cerrado**

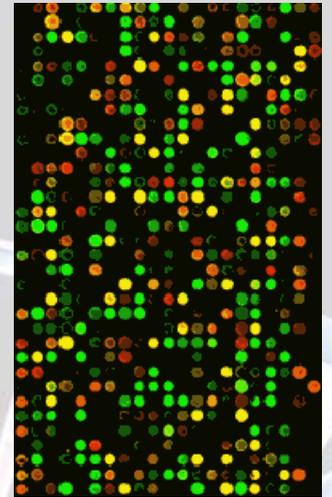
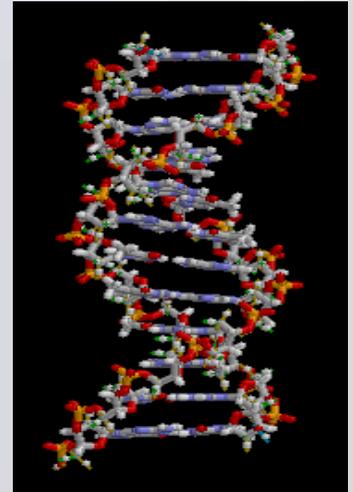
- **trabajo manual**



# *Perspectivas: Genotipage en larga escala*

## **DNA array -Chips**

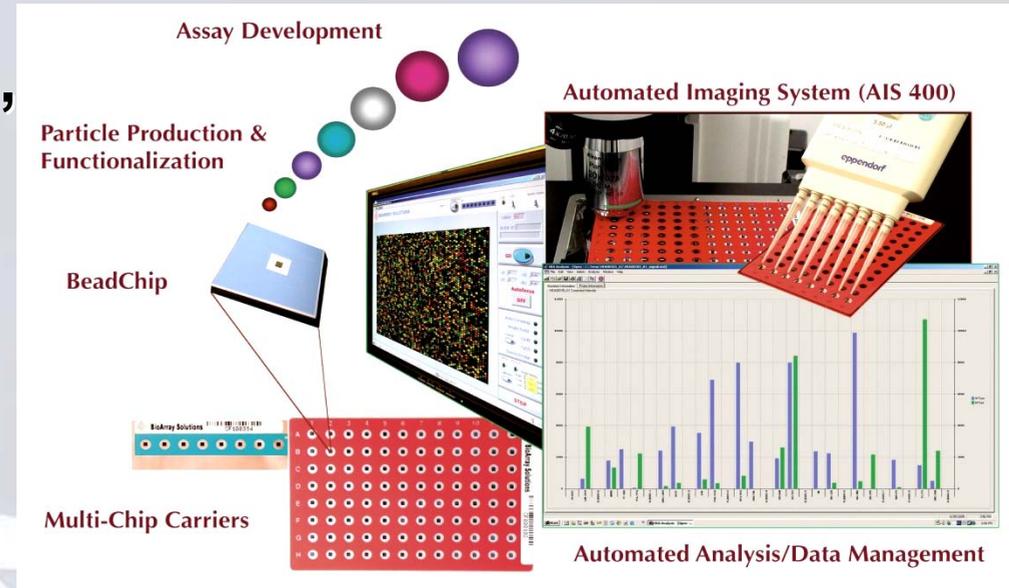
- Grande número de muestras (buena plataforma para donantes de sangre)
- PCR multiplex
- Análisis pos-PCR rápida, automática para numerosos polimorfismos de grupos sanguíneos
- Sistema cerrado para prevenir contaminación
- Análisis computadorizada de los resultados
- Download directo de las interpretaciones para la base de datos





# DNA array -BeadChip™

- Genotipage para: C/c, E/e, Kk, MNSs, Jk<sup>a</sup> /Jk<sup>b</sup>, Fy<sup>a</sup>/Fy<sup>b</sup>, Di<sup>a</sup>/Di<sup>b</sup>, Co<sup>a</sup>/Co<sup>b</sup>, Lw<sup>a</sup>/Lw<sup>b</sup>, Sc1/Sc2, Lu<sup>a</sup>/Lu<sup>b</sup> **Do<sup>a</sup>/Do<sup>b</sup>**, **Hy, Jo<sup>a</sup>**,
- **Hgb S**
- **Costo es competitivo**



# Resultados de las análisis por DNA

PCR-RFLP, AS-PCR

Fenotipo					Genotipo mas probable	Genotipo atual [n]
D	C	E	c	e		
+	+	-	-	+	$R^1R^1$	$R^1R^1$ 12 $R^1r'$ 2
+	+	+	+	+	$R^1R^2$	$R^1R^2$ 4
+	-	+	+	-	$R^2R^2$	$R^2R^2$ 11 $R^2r''$ 1
+	+	+	-	+	$R^zR^1$	$R^zR^1$ 3
+	+	-	+	+	$R^1r$	$R^1r$ 2
+	-	+	+	+	$R^2r$	$R^2r$ 2
+	-	-	+	+	$R^0r$	$R^0r$ 3 $R^0R^0$ 1

Total: 41 muestras

# Resultados de las análisis por DNA

PCR-RFLP

Fenotipo

Genotipo

Fy(a+b-)

FY\*A/FY\*A

30

FY\*A/FY\*X

3

Fy(a-b+)

FY\*B/FY\*B

24

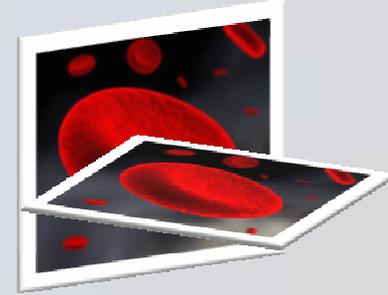
FY\*B/FY\*0

2

Total: 59 muestras

# **Resultados de la genotipage en la clínica**

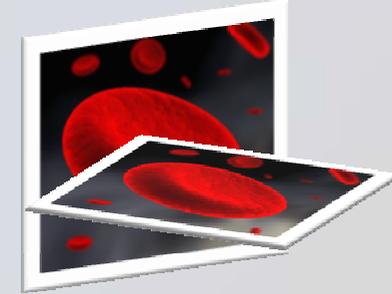
## **Caso Clínico-Histórico**



- Paciente femenina descendente de Asiáticos, 56 años
- 4 embarazos, transfusiones previas?
- Paciente en diálisis, atendida para cirugía
- Solicitado 2 unidades de sangre
- PAI positiva 2+ en AGH
- Panel positivo 2+ en AGH con todas las células, negativo con DTT
- Autocontrol negativo

# Resultados de la genotipage en la clínica

## Caso Clínico-Genotipagem



ChipName	Sample	WarnMsg	c	C	e	E	K	k	Fya	Fyb	Jka	Jkb	M	N	S	s	Lua	Lub	Doa	Dob	Jo(a)	Hy	LWa	LWb	Dia	Dib	Coa	Cob	Sc1	Sc2	HgbS	Silencing FY	Fyx[Fy(b+w)]	Cmmnt
HEA04961_1	A1		+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	1	No	
HEA04961_2	A2		+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	No	No	
HEA04961_3	A3		+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	1	No	
HEA04961_4	A4		+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	2	1	
HEA04961_5	A5		+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+			

▪ Fenotipo de la paciente: O, Ro, K-k+, Fy(a-b-), Jk(a+b-), M+N-S-s+, Lu(a-b+), Do(a-b+), Hy+, Jo(a+), Di(a+b-), Co(a+b-), Sc1,-2

- Paciente con anti-Di<sup>b</sup>
- Confirmación serológica en gel con anti-Di<sup>b</sup>

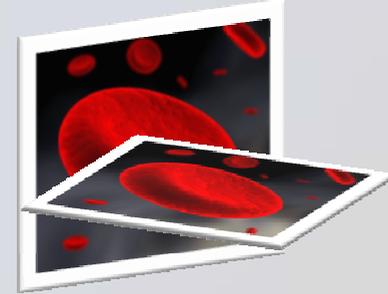
# Alelos raros encontrados en la genotipage en larga escala

## DNA array

Genotipos	Fenotipos deducidos	Donantes
<i>KEL</i> *1/1	K-k+	1
<i>GYPB</i> * S-s-	S-s-U-	5
<i>FY</i> *A/B (265)	Fy(a+b <sup>x</sup> )	6
<i>LU</i> *A/B	Lu(a+b+)	6
<i>LU</i> *A/A	Lu(a+b-)	3
<i>CO</i> *A/B	Co(a+b+)	8
<i>GYPB</i> * S-s-	S-s-U <sup>var</sup>	2
<i>HY</i> 323 T	Hy-	2
<i>JO</i> 350 T	Jo(a-)	3
<i>DI</i> *A/B	Di(a+b+)	9
<i>DI</i> *A/A	Di(a+b-)	1
<b>Total</b>		<b>46/1000(4.6%)</b>

# Resultados de la genotipage en la clínica

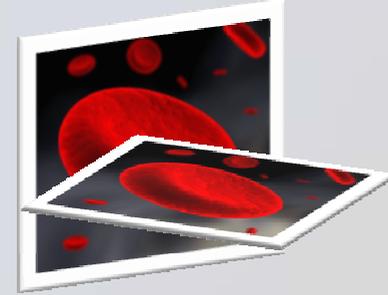
## Caso Clínico-Genotipage



- Paciente aloimmunizado con anti-c, anti-K, anti-Jk<sup>a</sup> y otro aloac? Recibiendo sangre fenotipo compatible
- Fenotipage del paciente: R<sub>0</sub>r, K-k<sup>+</sup>, Fy(a+b-), Jk(a-b<sup>+</sup>)
- Genotipage del paciente:
  - *RHD+ RHCE\*cc RHCE\*ee, KEL\*2/KEL\*2, FY\*A/FY\*A, JK\*B/JK\*B*

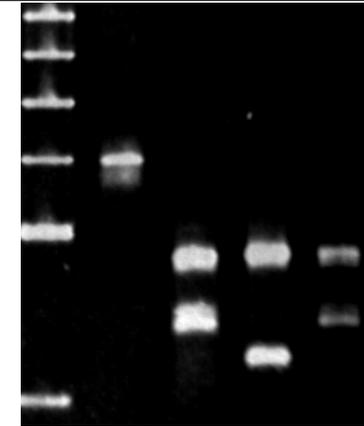
# Resultados de la genotipage en la clínica

## Caso Clínico-Genotipage



- Análisis molecular complementar:

*DO\*A/DO\*A*

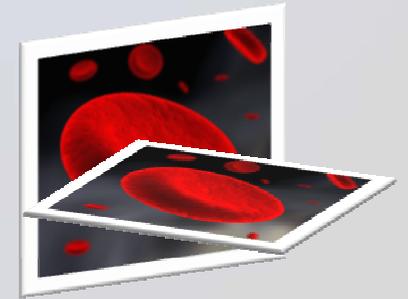


- Análisis serológica complementar

- adsorción con hematíes R<sub>1</sub>r, K<sup>+</sup>, Jk(a<sup>+</sup>), Do(b<sup>-</sup>) : anti-Do<sup>b</sup>

- Conclusión: Paciente portador de anti-c, -K, -Jk<sup>a</sup>, Do<sup>b</sup>

# *Posibilidad de utilización de sangre con compatibilidad mas exacta*



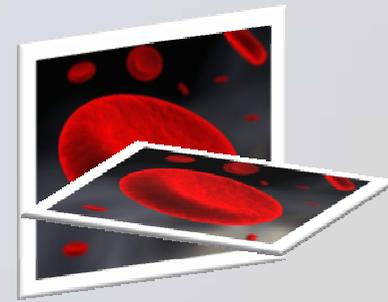
DNA array

## ➤ **Pacientes que necesitan de transfusión**

- **Especialmente fenotipos Rh raros ( $hr^{B-}$ ,  $hr^{S-}$ , etc.)**
- **Poseen anticuerpos contra antígenos de baja o alta incidencia para los cuales no hay anticuerpos**
- **Presentan múltiples anticuerpos**

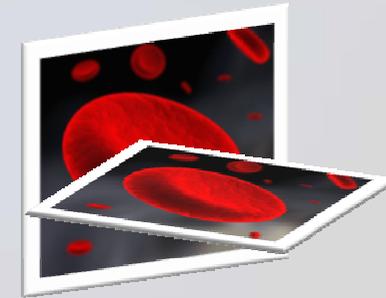


# **Caso Clínico**



- **Paciente Afro brasileira, sexo femenino, 36 años con sangramiento vaginal**
- **Solicitado 2 unidades de sangre**
- **2 embarazos**
- **Tipaje como O RhD+**
- **Anti-D débil detectado en el suero**
- **Sin historia de profilaxis Rh (obvio!)**

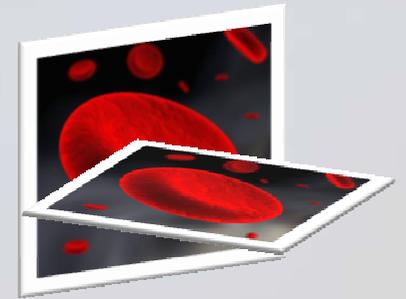
# Caso Clínico



Suero testado con panel de 6 monoclonales para detectar D parcial

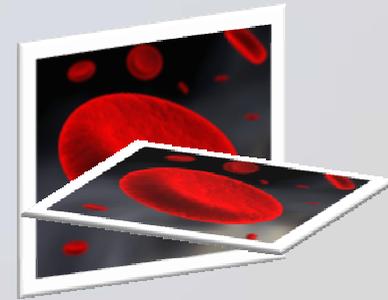
Anti-D	D <sup>III</sup>	D <sup>IV</sup>	D <sup>V</sup>	D <sup>VI</sup>	D <sup>VII</sup>	DAR	DFR	Paciente
1	+	+	+/-	-	+	+	+	3+
2	+	-	+	+	+	+	+	3+
3	+	+/-	+/-	-	+	-	-	3+
4	+	+	+	-	+	+	+	3+
5	+	-	+/-	-	+	-	+	3+
6	+	-	+	+	+	+	+	3+

# Caso Clínico



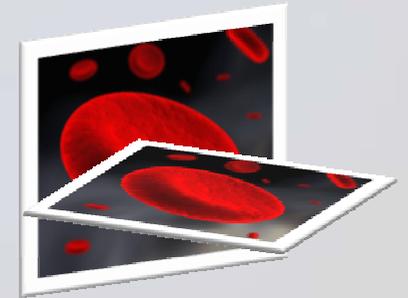
- **Sospechas:**
  - D Normal – pero por que el anticuerpo?
  - D<sup>III</sup>?
  - D<sup>VII</sup>?
  - Otro D parcial?
- **Análisis Molecular – screening de rutina mostró *RHD* normal**
- **Ninguno gene híbrido presente**

# ***Análise del DNA***



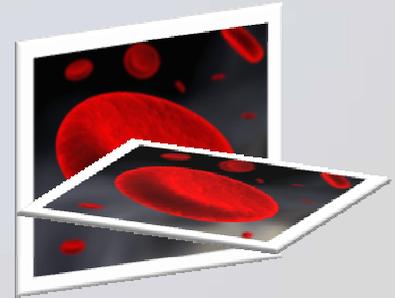
- **PCR-SSP para DVII: negativo**
- **PCR-RFLP para DIIIa: positivo**
- **DIIIa!**
- **Paciente tendría el fenotipo D parcial**
- **Anti-D era un aloanticuerpo**
- **Paciente quedose muy nervosa porque su tipo de sangre tenia un error!**

# ***Caso Clínico***



- **Paciente Caucasoide, sexo masculino, sospecha de AHAI**
- **PAI positiva, Auto y TDA positivos**
- **Anti-D detectado en el suero y eluato**
- **Paciente tipado como D+**
- **Anti-D: auto o alo?**
- **Genotipage!!!!**

# ***Caso Clínico***



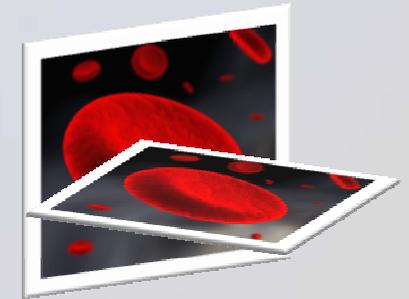
- **Análisis molecular de rutina demostró un gene *RHD* normal**
- **Ninguno gene híbrido presente, no era DIII y tampoco DVII**
- **Secuenciamiento del gene *RHD*: normal**
- **Conclusión: auto-anti-D**

# ***Caso Clínico***



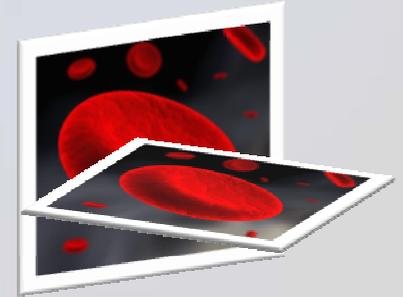
- **Donante con 9 donaciones previas**
- **Fenotipado como O RhD-neg en todas las donaciones**
- **En la 10<sup>0</sup> donación: Sospecha de D débil o Del?**
- **Genotipage!!!!**

# ***Caso Clínico***



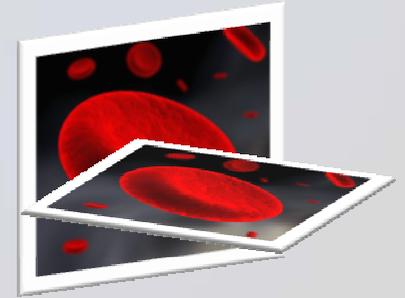
- **Análisis molecular demostró un gene *RHD* delectado**
- **Ninguno D débil, DEL y D parcial detectado**
- **Conclusión: Donante RhD-negativo**

# ***Caso Clínico***



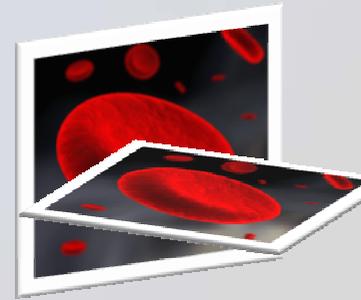
- Donante con 15 donaciones previas
- Fenotipado como O RhD-neg en todas las donaciones
- En la 15<sup>o</sup> donación: Genotipage *RHD*
- Genotipo: *RHD+*

# Caso Clínico



- **Análisis molecular inicial demostró un gene *RHD* normal**
- **Análisis complementario demostró alteración compatible con DEL = *RHD*(K409K)**
- **Conclusión: Donante RhD+ (DEL)**

# Goodbye to agglutination and all that



www.transfusion.org Vol. 45, No. 5, May 2005

# TRANSFUSION

The diagram is divided into two main sections: "FROM ENCODED BEADS TO RANDOM ARRAY" and "FROM ARRAY TO DATA".

**FROM ENCODED BEADS TO RANDOM ARRAY:** This section shows "Probe 1", "Probe 2", and "Probe N" being added to a "DECODING IMAGE" of a bead array. Below the image is a "BioArray Solutions" device. The "DECODING IMAGE" is a colorful grid of spots.

**FROM ARRAY TO DATA:** This section shows an "ASSAY IMAGE" of the same array, which is mostly black with some white spots. To the right, a DNA sequence is shown with a mismatch marked with an 'X'. Below the image is an "ANALYSIS" bar chart and a legend for "MATCH" (purple dot) and "MISMATCH" (orange dot).

\*Anstee DJ.  
Transfusion 2005;  
45:652-3

aa  
BB

# El fin de la serología está próximo?

EDITORIAL

## Goodbye to agglutination and all that?

David J. Anstee

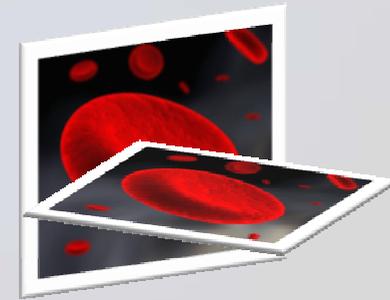
*Director, Bristol Institute for Transfusion Sciences*

*Southwood Road*

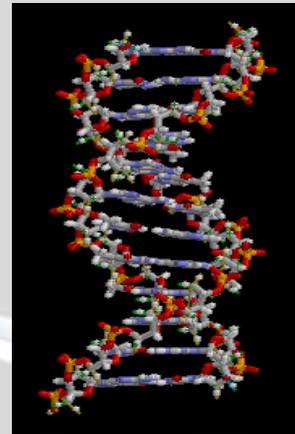
*Bristol BS10 5ND, UK*

*e-mail: david.anstee@nbs.nhs.uk*

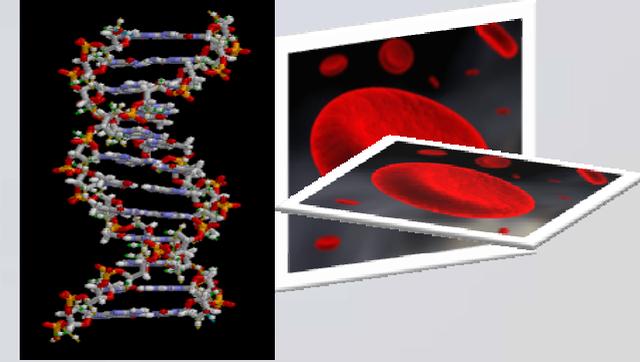
Volume 45, May 2005 TRANSFUSION 653



- Un genotipo no es un fenotipo
- Genotipage molecular para el complejo RH – no es todos los alelos aun descritos
- Validación y ensayos clínicos con los chips deben asegurar la confiabilidad de los resultados de la genotipage
- Interpretación de un grupo ABO incorrecta puede ser desastrosa
- Nuevas mutaciones con genes de grupos sanguíneos continuaron a surgir y, pueden ser necesarias actualizaciones de los chips

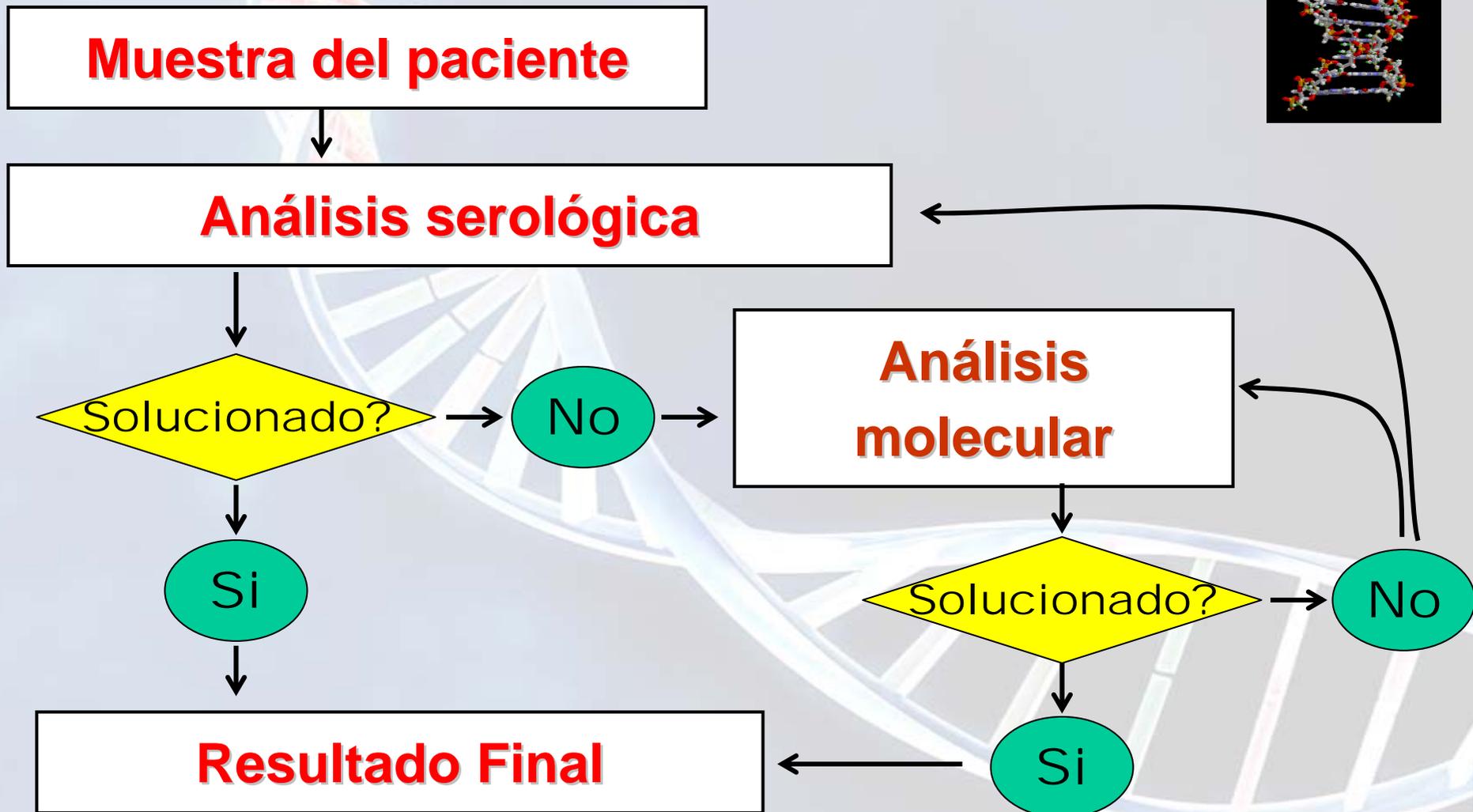
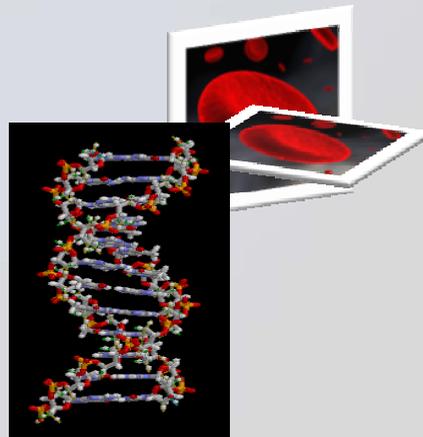


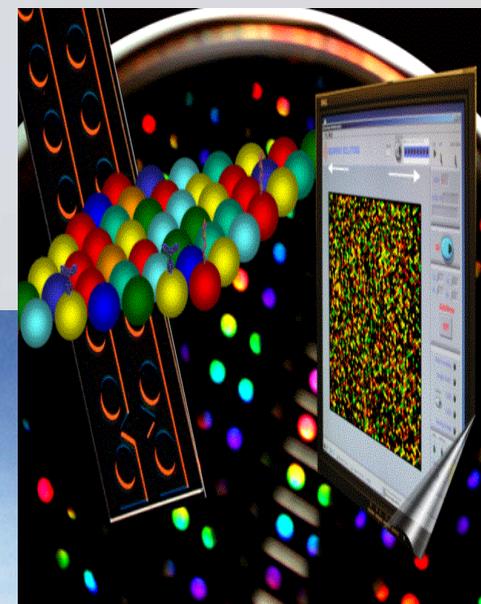
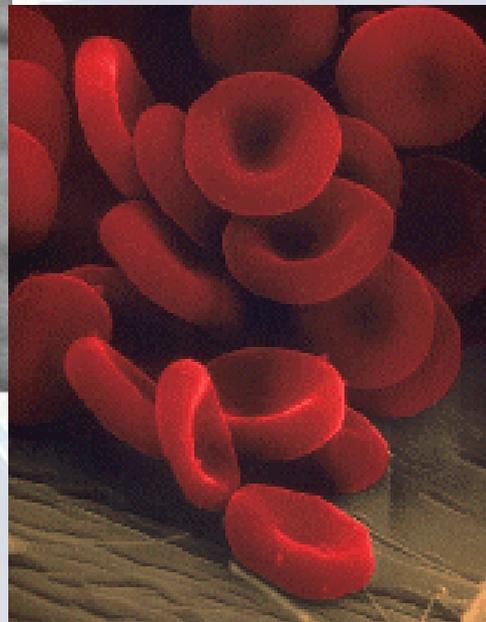
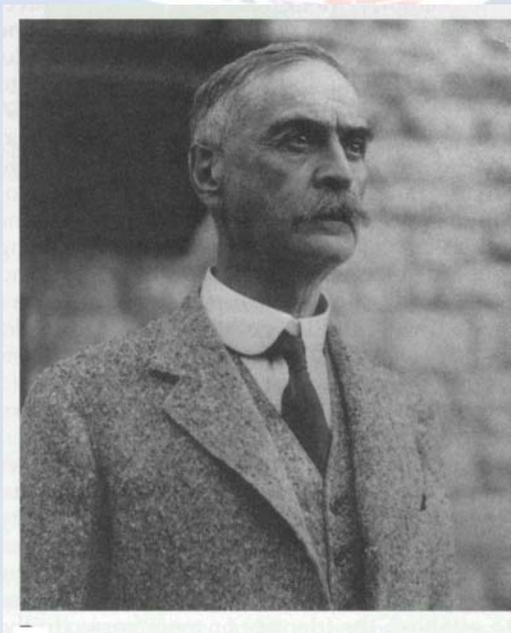
# “Simbiosis”



- **Programas para fenotipar pacientes que serán transfundidos regularmente: pacientes con Anemia Falciforme y Talasemia**
- **Tipaje y confirmación de antígenos de grupos sanguíneos en las hematías de donantes de sangre:**
  - **screening para aumentar los estoques de antígenos negativos**

# Testes moleculares caminan lado a lado con la hemaglutinación





# Evolución de la Hemaglutinación Inmunohematología



DNA: PCR

DNA: Microarray

# ***Conclusión: Simbiosis!!!!***

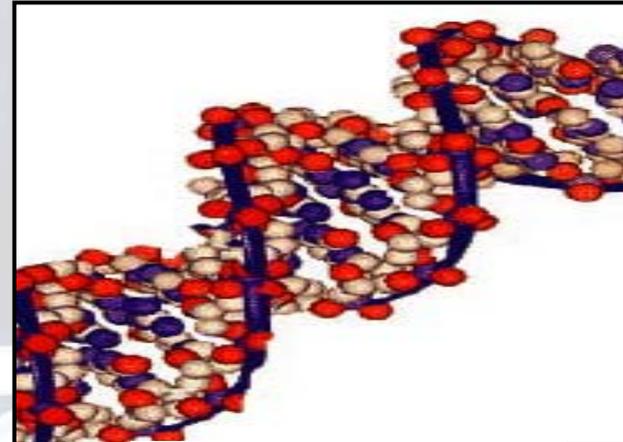
**Fenotipo**



**Testes serológicos**

+

**Genotipo**



**Testes moleculares**