



ACTUALIZACIÓN EN INMUHEMATOLOGIA:NUEVAS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS

Mariza Mota,MD,PhD

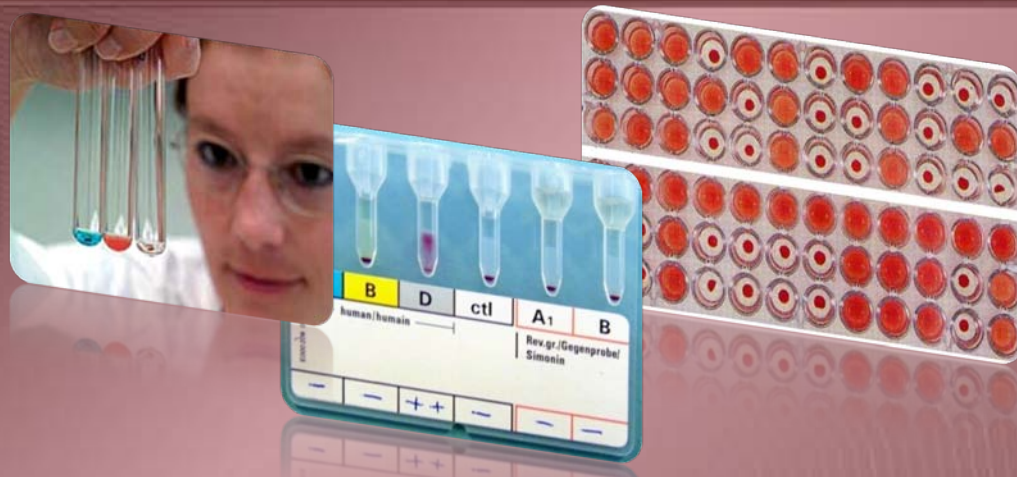
Hospital Israelita Albert Einstein – São Paulo, Brasil

06 y 07 /10 /2011

Jornada de Hematología y Medicina Transfusional de la Sociedad Chilena de Hematología



Hemaglutinación



- Es la mezcla de eritrocitos lavados con anticuerpos específicos anti-eritrocitarios (monoclonales o policlonales) pero algunos no estan disponibles o en pequeñas cantidad
- Es una prueba con más de 100 años (1901 Nobel Laureate Karl Landsteiner,)
- La serología rutina grupo sanguíneo se dirige hacia la detección de antígenos de grupo sanguíneo: ABO, RH clínicamente significativo, KEL, FY, JK y MNS
- La aloinmunización es detectados por P.A.I. (pesquisa de anticuerpos irregulares) y la compatibilidad entre beneficiarios y donantes

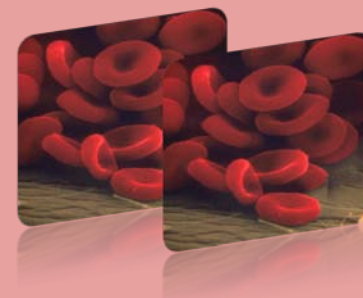
**Esta metodología ha permitido el desarrollo
y la práctica de la medicina de transfusión durante el siglo XX**



HEMAGLUTINACIÓN

LIMITACIONES:

- Fenotipagem en pacientes politransfundidos
- Fenotipagem de glóbulos rojos cubiertos con IgG
- Identificación de ags variantes
- Identificación de ags de baja y alta frecuencia
- Otros :
 - Falta de reactivos policlonales y monoclonales
 - Caracterización incompleta de los reactivos de glóbulos rojos utilizados en la detección y identificación de anticuerpos
 - Variabilidad de reactividad de los anticuerpos monoclonales
 - Baja reactividad de los anticuerpos que son clínicamente significantes
 - Falta de un único método (universal) para la detección y identificación de anticuerpos
 - Subjetividad en la lectura e interpretación de los resultados





HEMAGLUTINACIÓN

Limitaciones de los reactivos de los glóbulos rojos

- Dificultad en obtener la inclusión de células homocigotas para los ags D, C, c, E, e, Fy^a, Jk^a, S y ags de baja incidencia
- Límite de inclusión y exclusión de aloanticuerpos debido a falhas em los paneles de glóbulos rojos
- Control de calidad de reactivos hematíes (determinación de zigocidade de los antígenos D, Fy^a, Fy^b)



HEMAGLUTINACIÓN

Limitaciones de fenotipagem de los grupos de sangre

- Pruebas y la inclusión de los datos es que requieren mucho trabajo
- Número de donantes que pueden ser fenotipados es pequeño
- Proporcionar a los pacientes sangre antígeno negativo cuando teine el anticuerpo correspondiente
- Proporcionar sangre con fenotipo compatible para los pacientes politransfundidos



COMMENTARY

Transfusion medicine: discipline with a future

Jeffrey McCullough

Jeffrey McCullough

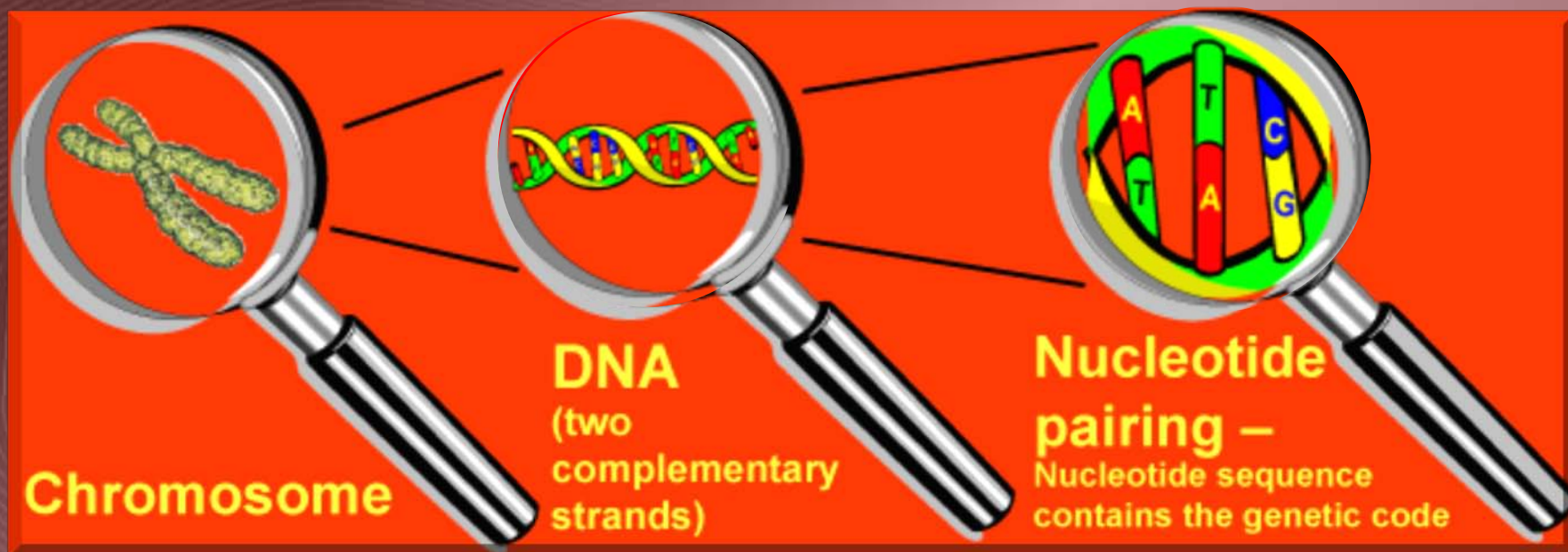
El especialista de Medicina de la transfusión del futuro tendrá a su disposición ... técnicas moleculares para identificar genotipos eritrocitarios

Jeff McCullough

Transfusion 2003,43:823-28, Editorial



Zoom en AND



Genotipo !!!

Resultados seguros en situaciones donde la hemaglutinación es limitada



Antígenos de grupos de sangre productos génicos

- Antígenos son proteínas que están codificados directamente por los genes
- Antígenos de hidratos de carbono están bajo el control de los genes que codifican glicosiltransferases
- Todos los genes ya han sido secuenciados
- Los polimorfismos de GS son definidos genéticamente
- Análisis molecular de los genes de GS pueden ser útil en la clínica
- Comprensión de las bases moleculares de GS exploró sus funciones



Aplicaciones de pruebas moleculares en donantes de sangre

- Genotipagem en gran escala para la identificación de los antígenos comunes y raros
- Producción de paneles de glóbulos rojos adicionales
- Determinar la zigocidad de los antígenos D, Fy^a y Fy^b para control de calidad de reactivos comerciales
- Determinación del factor Rh variantes (D débil, D_{el}, e^{var})
- Proporcionar sangre antígeno negativo para los pacientes con aloanticuerpos



Aplicaciones de pruebas moleculares en medicina de transfusión

- Apoyar la transfusión en pacientes politransfundidos o aloimmunizados para disminuir o evitar la aloimmunización
- Transfusión de apoyo en pacientes con prueba directa de AGH positivo
- Identificación de fenotipos raros
- Identificación de las variantes Rh con riesgo de aloimmunización
- Confirmación de genotipo cuando un antígeno es débilmente
- Resolución de las discrepancias ABO, RhD,



Aplicaciones de pruebas moleculares en medicina materna fetal

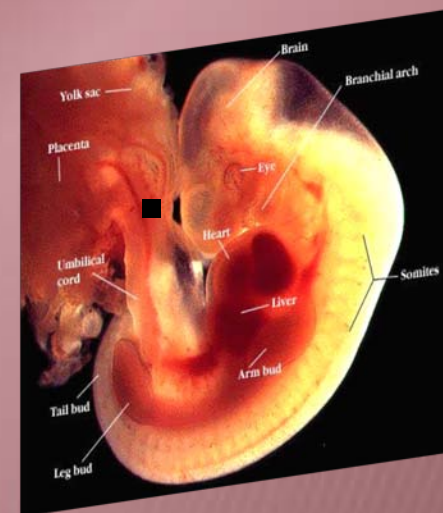


- La madre tiene anticuerpos IgG clínicamente significativos
- Padre es heterocigoto para el gen que codifica el antígeno de interés o padre desconocido
- Determinación de ADN fetal en plasma materno



Determinación de ADN fetal en plasma materno

Fuentes de ADN fetales



- Amniócitos y vellosidad coriónica
- Células fetales en la sangre materna
- ADN libre en plasma materno
- Hay células fetales que circulan en la sangre materna en todas las etapas del embarazo (tasas de 1: 5.000/5.000.000)
- Tipos celulares: Trofoblastos, eritrocitos, leucocitos y células progenitoras CD34 +



Determinación de ADN fetal en plasma materno

ADN FETAL LIBRE EXISTE EN SUERO O PLASMA MATERNO EN PROPORCIONES MUCHO MAYORES QUE LAS CÉLULAS FETALES

Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis.

Lo Y-M et al, Am J Hum Genet, 1998, 62: 768-775.

Resultados de 30 embarazadas con fetos masculinos

24 plasma, 21 suero y 5 buffy-coat

25.4 genome equivalents/mL (early pregnancy) - 3,4%

292.2 genome equivalents/mL (late pregnancy) - 6,2%



Determinación de ADN fetal en plasma materno

Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service

Avent et al, Transfusion 2002, 42: 1079- 1085

Fetal blod group genotyping from DNA from maternal plasma: an important advance in the management and prevention of haemolytic disease of the fetus newborn Daniels et al, Vox sanguinis 2004, 87: 225-232

Fetal RhD genotyping from maternal plasma in a population with a higly diverse ethnic background . Castilho et al., Ver Assoc Med Bras. 2006, 52: 232-235.



Determinación de ADN fetal en plasma materno

ADN FETAL libre en PLASMA materno es eliminado rápidamente en las orina dentro de 48 horas después del parto

**Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma.
Lo Y-M et al, *Am J Hum Genet* 1999, 64: 218-224.**

La vida media de ADN fetal en circulación= 16 min (4 – 30)



Aplicaciones de pruebas moleculares reactivos hematíes de control de calidad

Fenotipo	Genotipo probable
A	<i>AA, AO</i>
RhD+	<i>RHD/RHD o RHD/-</i>
Fy(a+b-)	<i>FY*A/FY*A o FY*A/FY o FY*A/FY*X</i>
Fy(a-b+)	<i>FY*B/FY*B o FY*B/FY o FY*B/FY*X</i>



Mecanismos moleculares que conducen a la diversidad de los antígenos de G.S.

- *SNPs (single nucleotide polymorphisms)*

La mayoría

- **Inserción:**

- **Nucleótido (s) :** Rh, Colton

- **Eliminación**

- **Gen, Exon, Nucleótido(s):** ABO, MNS, Rh, Kell, Duffy, Dombrock

- **Transcripción: GATA**

- **Duplicación**

- **Exon:** Gerbich

- **Splicing alterados:** Jk(a-b-)

- **Conversión génica o recombinación:** MNS, Rh, Ch/Rg



SNPs (mutaciones puntuales missenses)

AAGTCAGCTGGACTTCGAAGATGTATGGAATTCTTCCTATGGTGTGAATGATTCCTTCCCAGATGGA
GACTATGATCCAACCTGGAAGCAGCTGCCCCCTGCCACTCCTGTAACCTG

(FYB) A (Asp42)

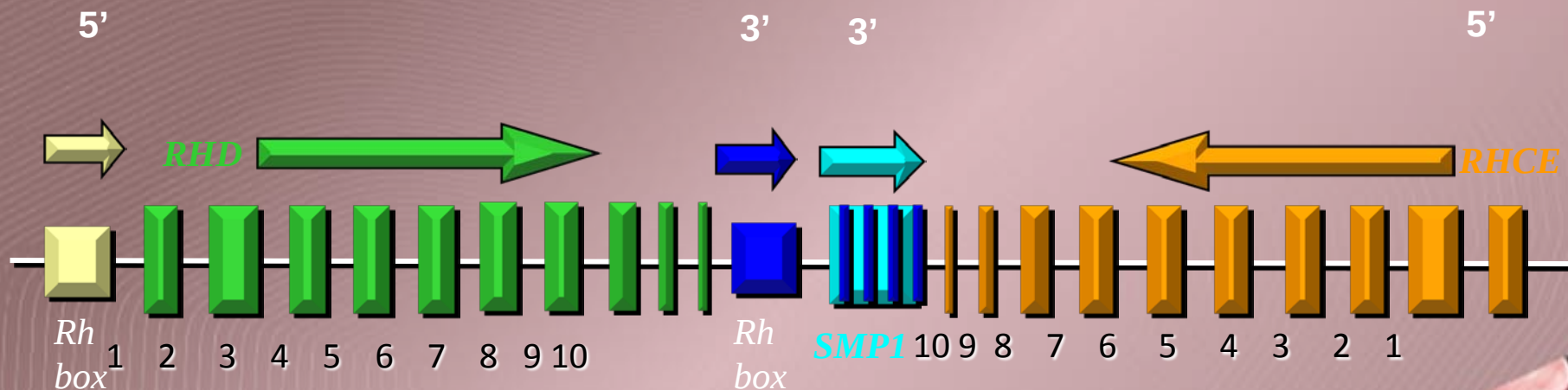
(FYA) G (Gly42)

- RH: C/C (Ser103Pro); E/e (Pro226Ala)
- MNS: S/s
- Kell: K/k, Kp^a/Kp^b, Js^a/Js^b
- Diego: Di^a/Di^b

- Duffy: Fy^a/Fy^b
- Kidd: Jk^a/Jk^b
- Lutheran: Lu^a/Lu^b
- Dombrock: Do^a/Do^b



GENES *RHD* y *RHCE*



WAGNER y FLEGEL, 2000

- 69Kb, 10 exones
- identidad de 95% (nt y aa)
- el gen RHD está cercado por 2 cajas Rhesus
- SMP= *Simple Membrane Protein*



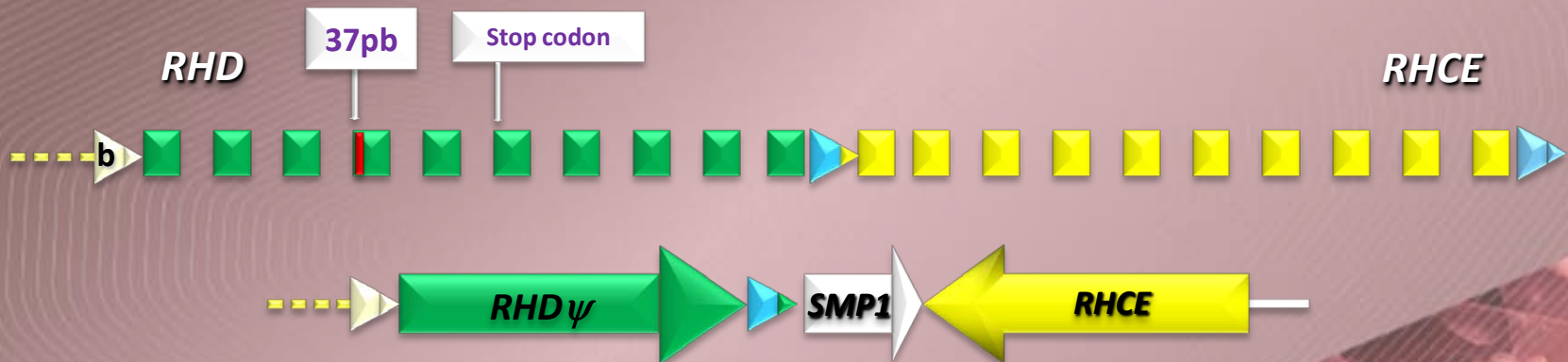
Fenotipo: D-positivo y D-negativo





Gen *RHD* ψ

Insertión de 37 pb – codón de parada prematura

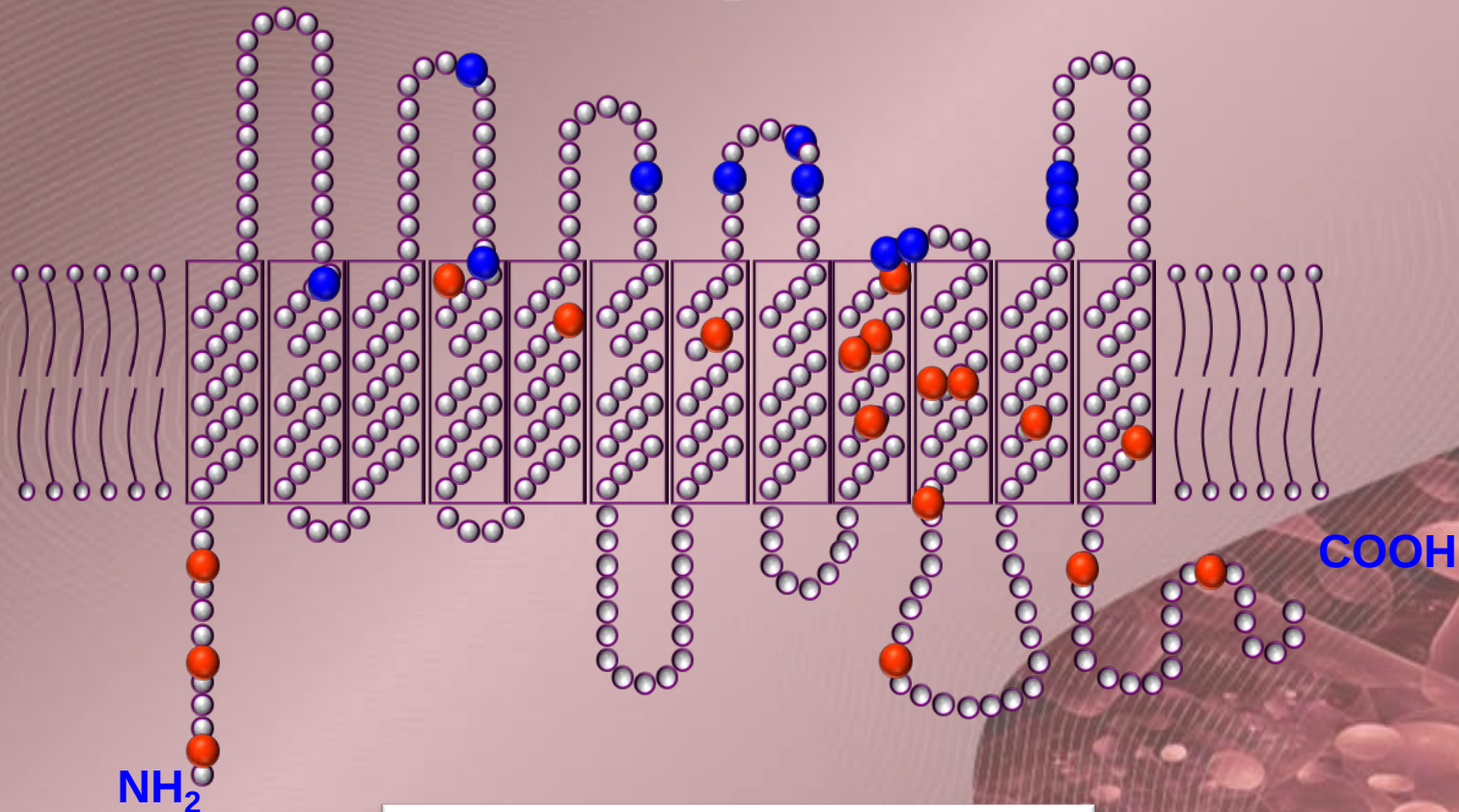


Genotipo: la presencia de genes *RHD*
Fenotipo: ausencia de gen *RHD*
Ocorre en 1/3 de individuos Africanos RhD -



Variantes RhD: D débil y D parcial

SNPs (mutaciones puntuales missenses)

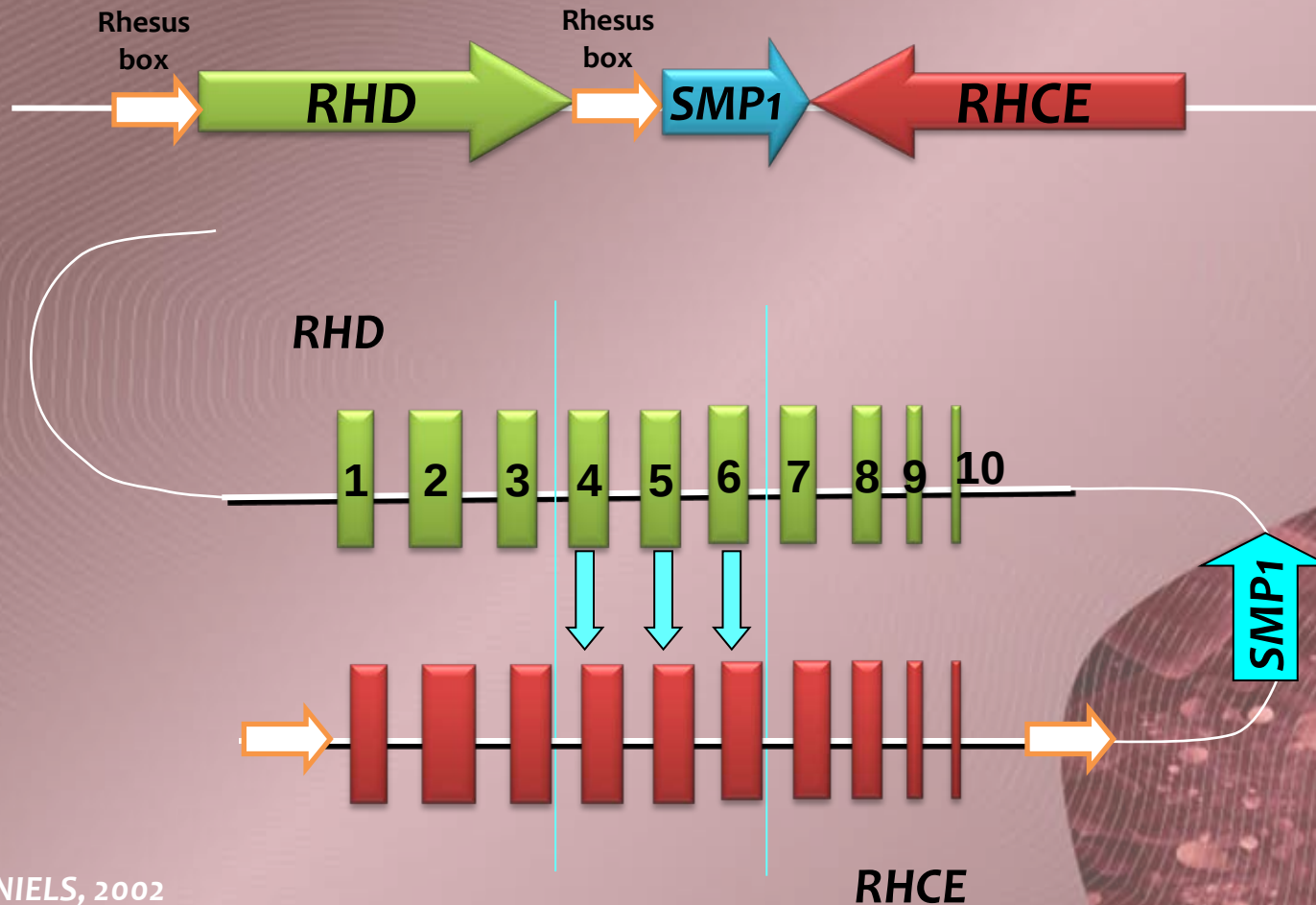


Rojo = D débil
Azul = D parcial



Variantes RhD

Reorganizaciones de genes





Reorganizaciones de genes

RHD

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Type II

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Type IIa

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Type IIb

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Type IIc

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Type IVa

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Type IVb

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Type Va

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

RHCE

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Type VI-1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Type VI-2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Type VII

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Type DFR

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Type DBT

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Type R₀Har

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----



DUFFY- Transcripción

Mutaciones en el promotor de genes que afectan a la expresión del antígeno en glóbulos rojos

GATA box

TATC

1

FYA/FY B

2

FY Normal

FY B

TACC

1

2

*FY Mutado**

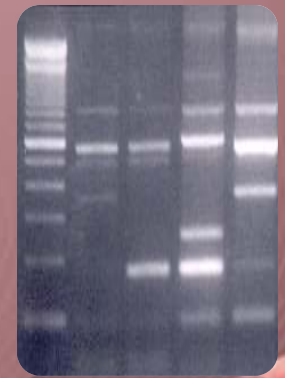
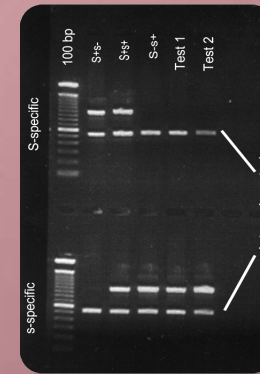
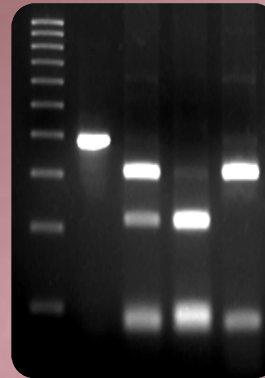
* Fenotipo Fy(a-b-)



Técnicas moleculares para el análisis genético de grupos sanguíneos

■ Amplificación de ADN por PCR

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

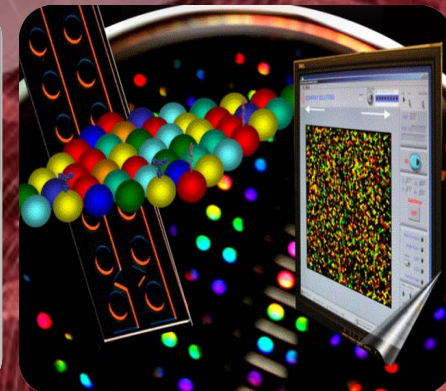
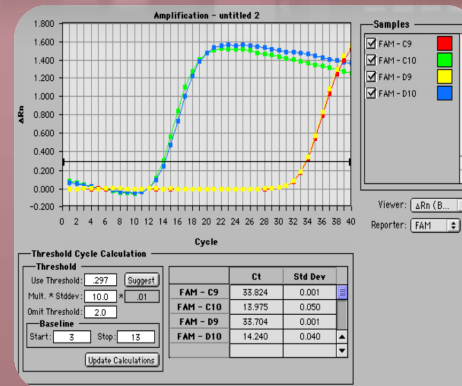
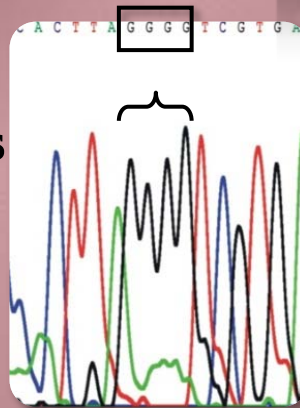


■ Secuenciación

■ Real time PCR

■ Métodos automáticos

- Microarray





Genotipo de grupos sanguineos

Técnicas empleadas actualmente son lentos y laboriosos

- **AS-PCR y PCR-RFLP análisis requieren**
 - **trabajo manual**
 - **análise por electroforese (gel de agarosa, poliacrilamida)**
 - **repeticiones**
 - **varias pruebas sobre la misma muestra**
- **PCR en tiempo real puede ser realizado en tubo cerrado**
 - **trabajo manual**



Perspectiva: 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

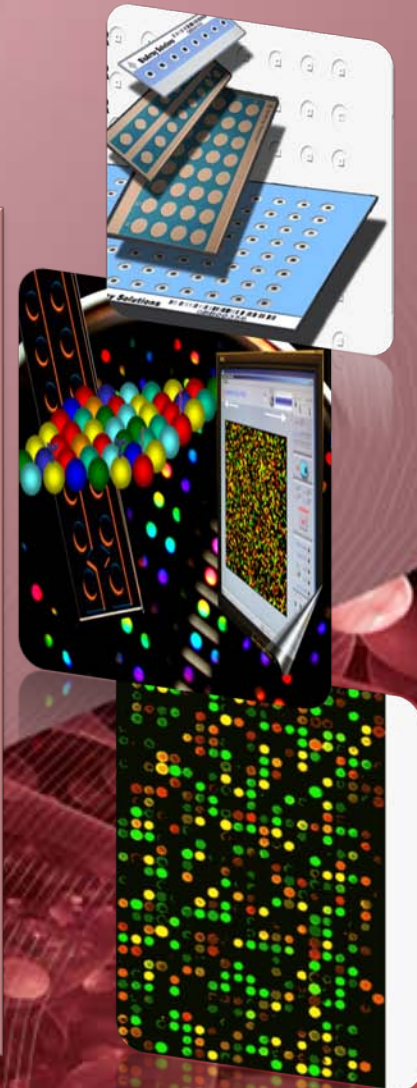
A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing

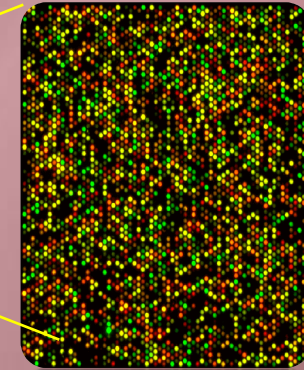
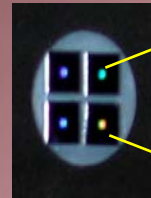
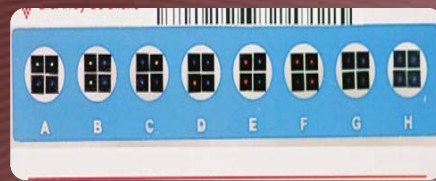
Ghazala Hashmi, Tasmia Shariff, Michael Seul, Prabhakar Vissavajjala, Kim Hue-Roye, Dalisay Charles-Pierre, Christine Lomas-Francis, Asok Chaudhuri, and Marion E. Reid



Matriz-Chips de ADN

- ¿Qué es un chip de ADN? (un chip es una matriz)
- **Informática:** almacena una lista de datos ordenados
- **Biología:** Grupo de moléculas de ADN son almacenados ordenadamente (PCR, oligonucleótidos...) en una superficie sólida (vidrio, nylon, módulos de sílica)

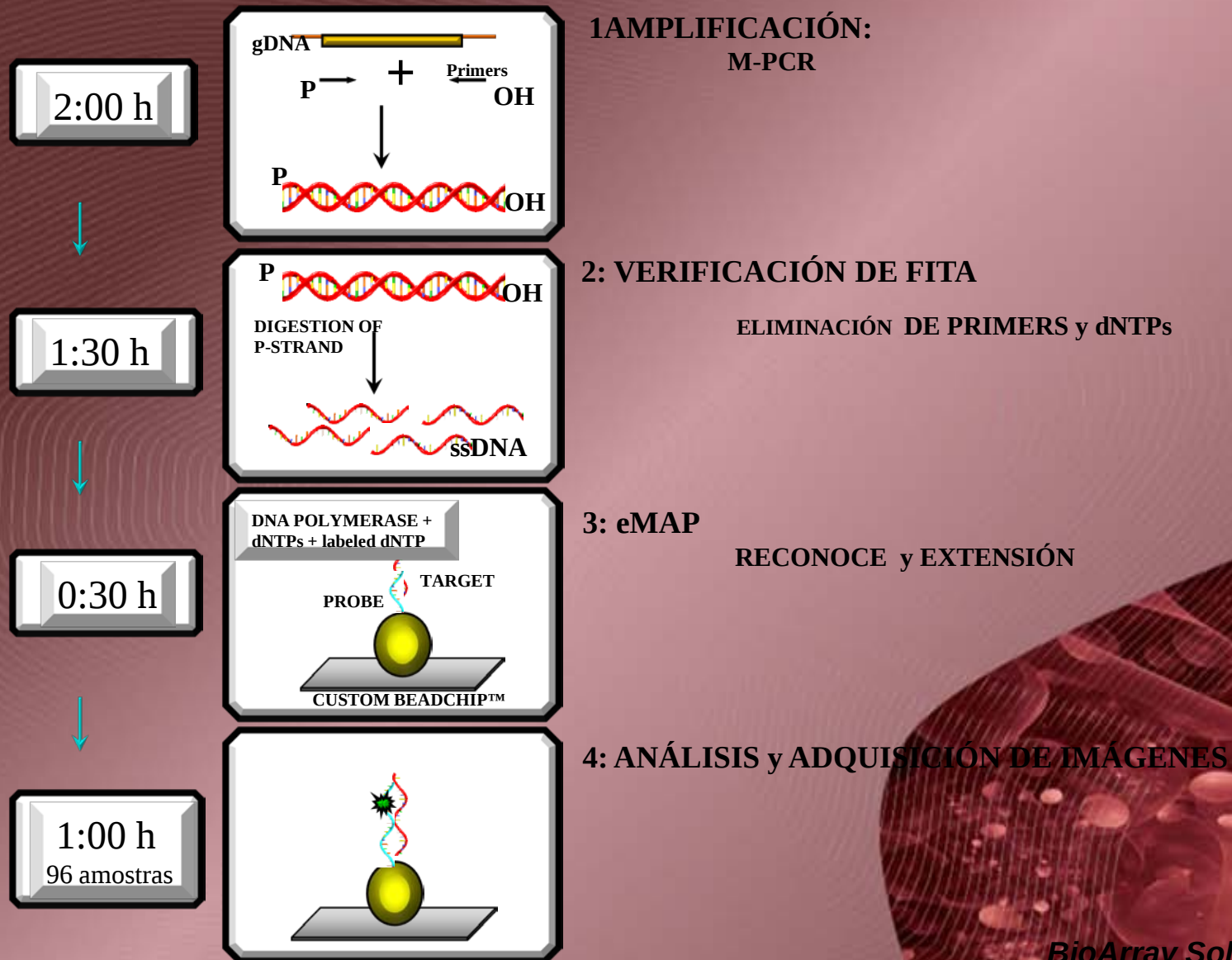




Producción

- Oligos colocados sobre una superficie de vidrio (50-100 micrones, 0,2-0,5 nL)
- Miles de secuencias
- Puede crear nuevos arreglos en semanas o meses

BeadChip™-Protocolo

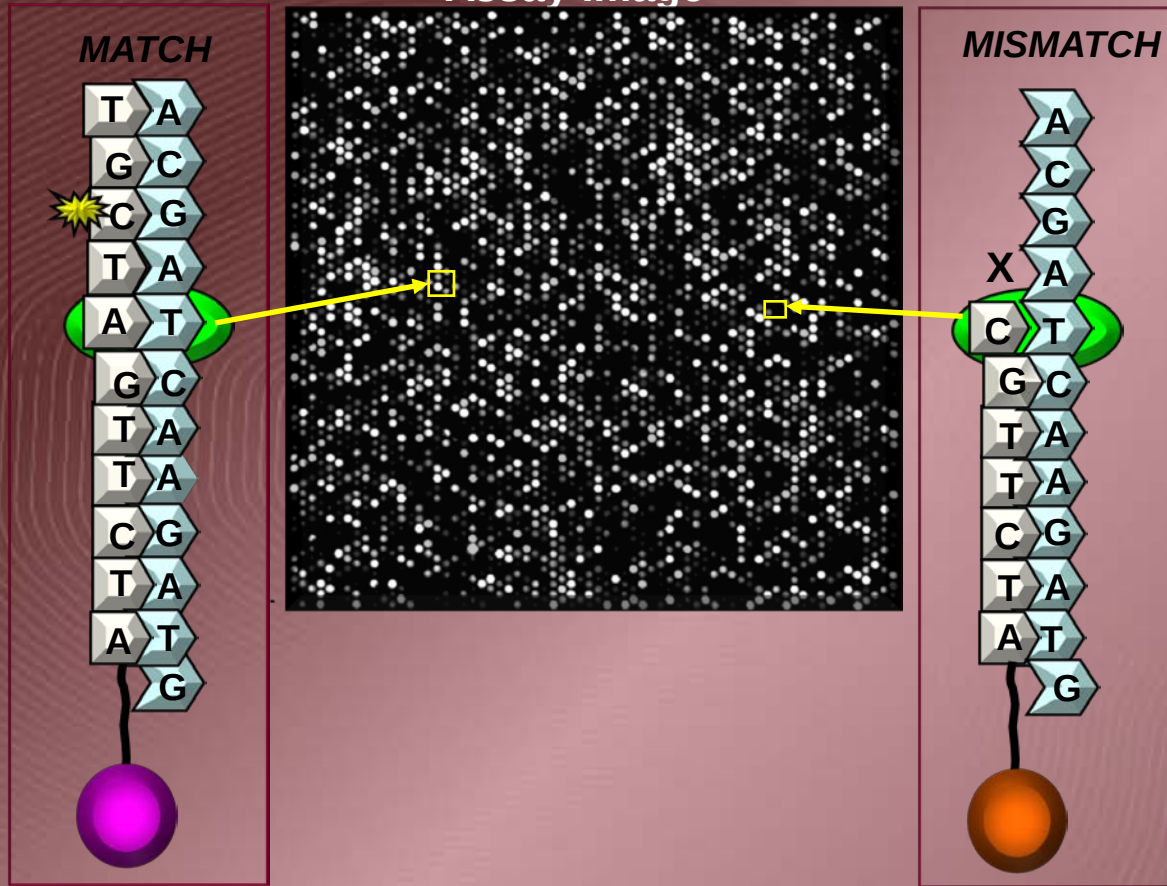


BeadChip™-Protocolo



Discriminación por extensión del alelo específico

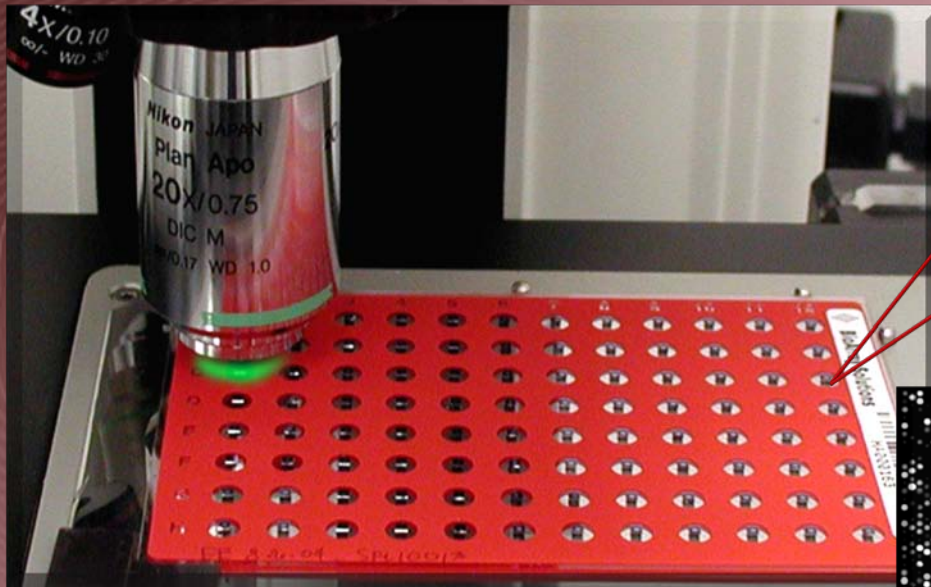
Assay Image



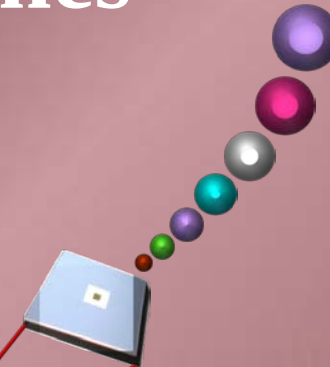
BeadChip™-Protocolo



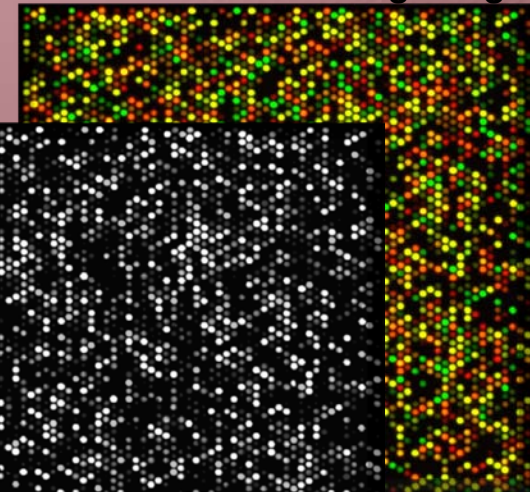
Adquisición de imágenes



Automated “Snapshot” Array Imaging



Decoding Image

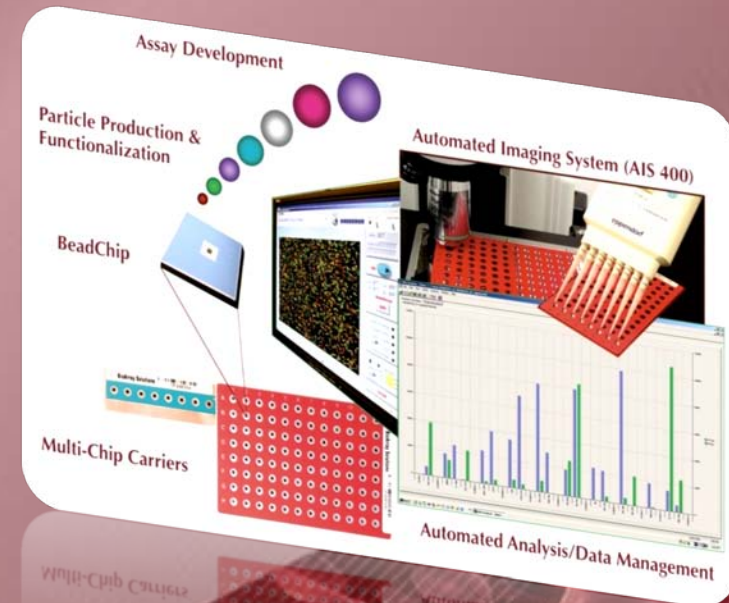


Assay Image

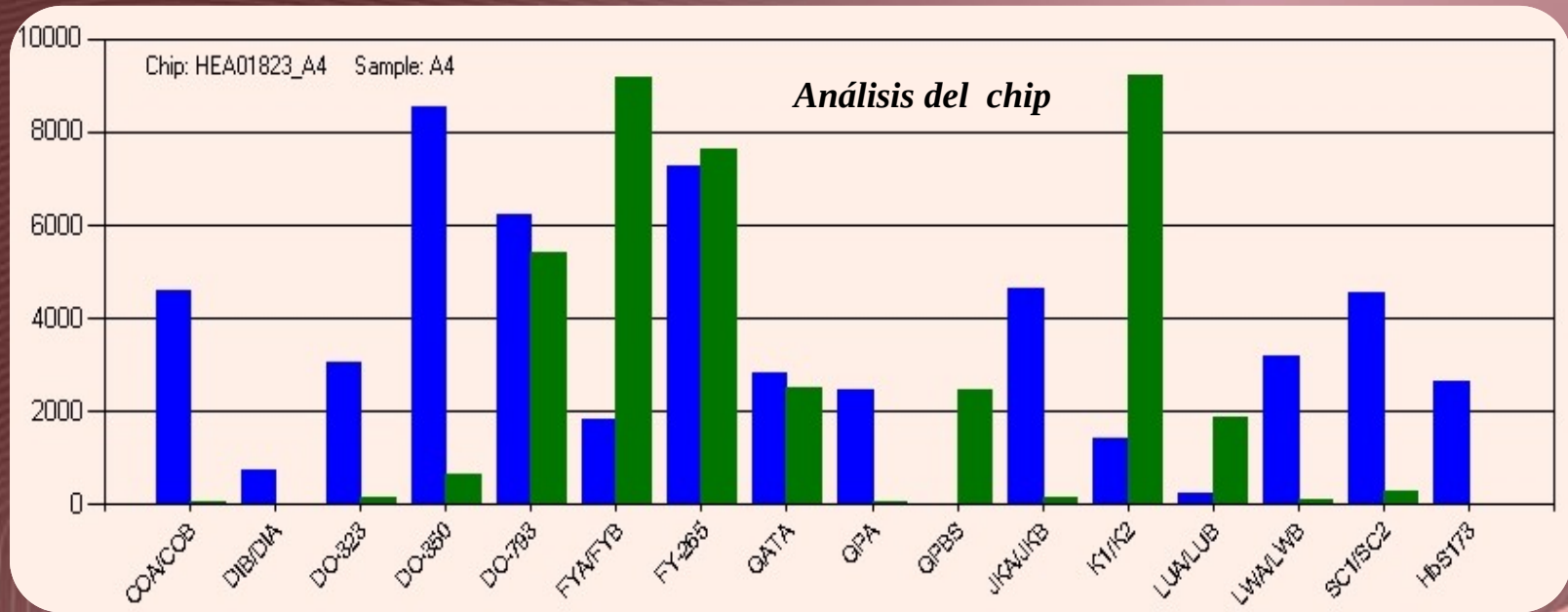
ADN array -BeadChip™



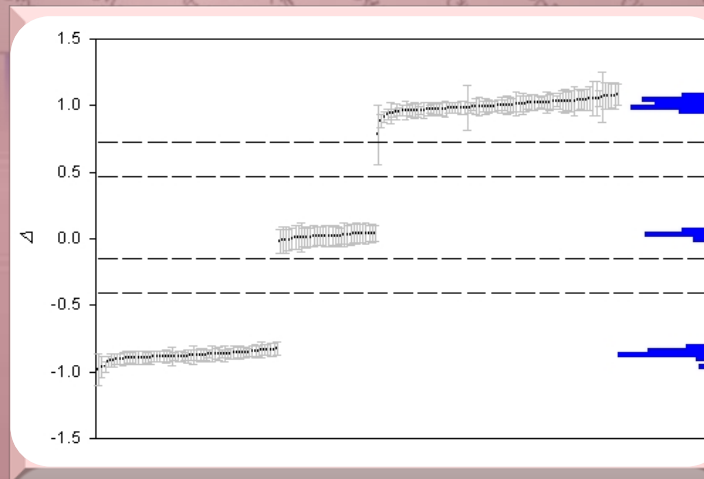
- **Genotipo Eritrocitario : C/c, E/e, K/k, MNSs, Jk^a /Jk^b, Fy^a/Fy^b, GATA, FY^x, Di^a/Di^b, Co^a/Co^b, U, U^{var}**
- **Lw^a/Lw^b, Sc1/Sc2, Lu^a/Lu^b Do^a/Do^b, Hy, Jo^a,**
- **Hgb S**
- **Genotipo de plaquetas: HPA1- 9, HPA11 y HPA5**
- **Variantes *RHD* y *RHCE***



Análisis de datos: genotipos



*Análisis de ADN
(para cada par de sondeos)*



AA

AB

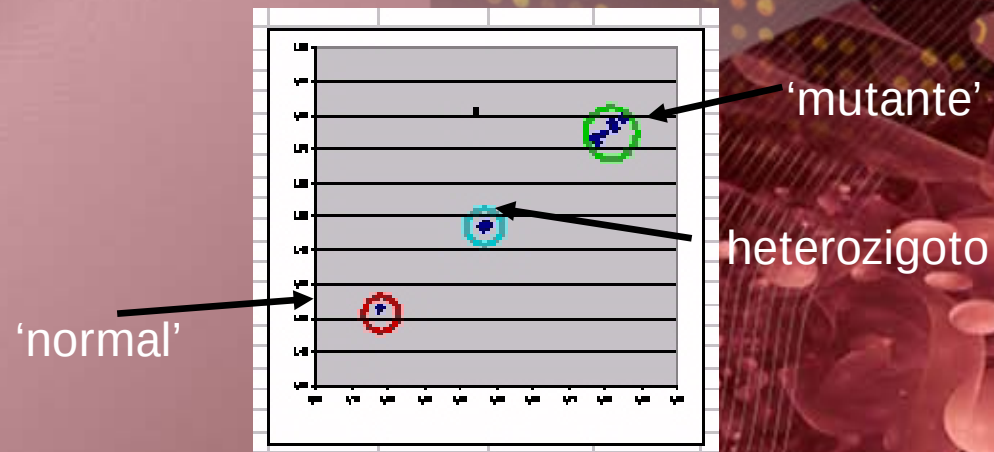
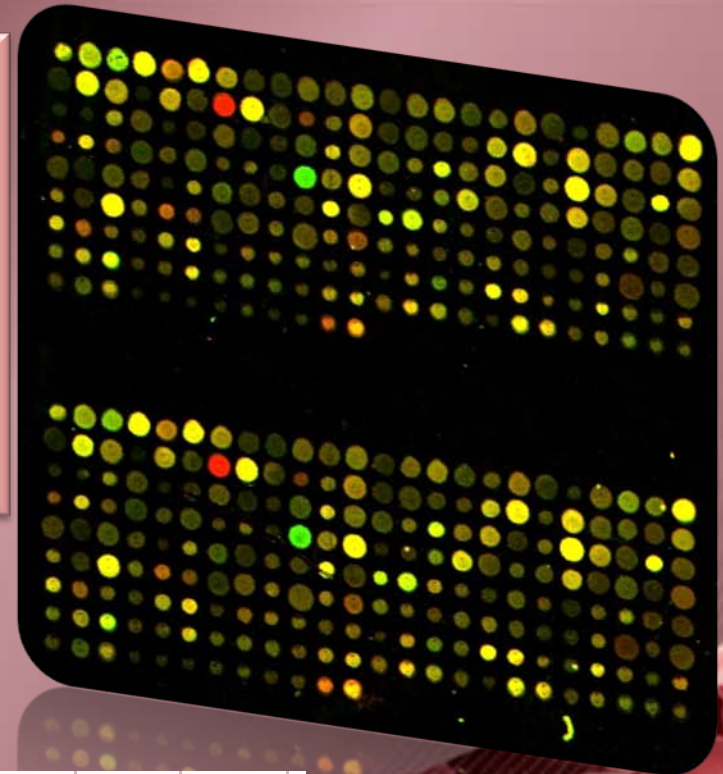
BB

DNA array : ID - CORE

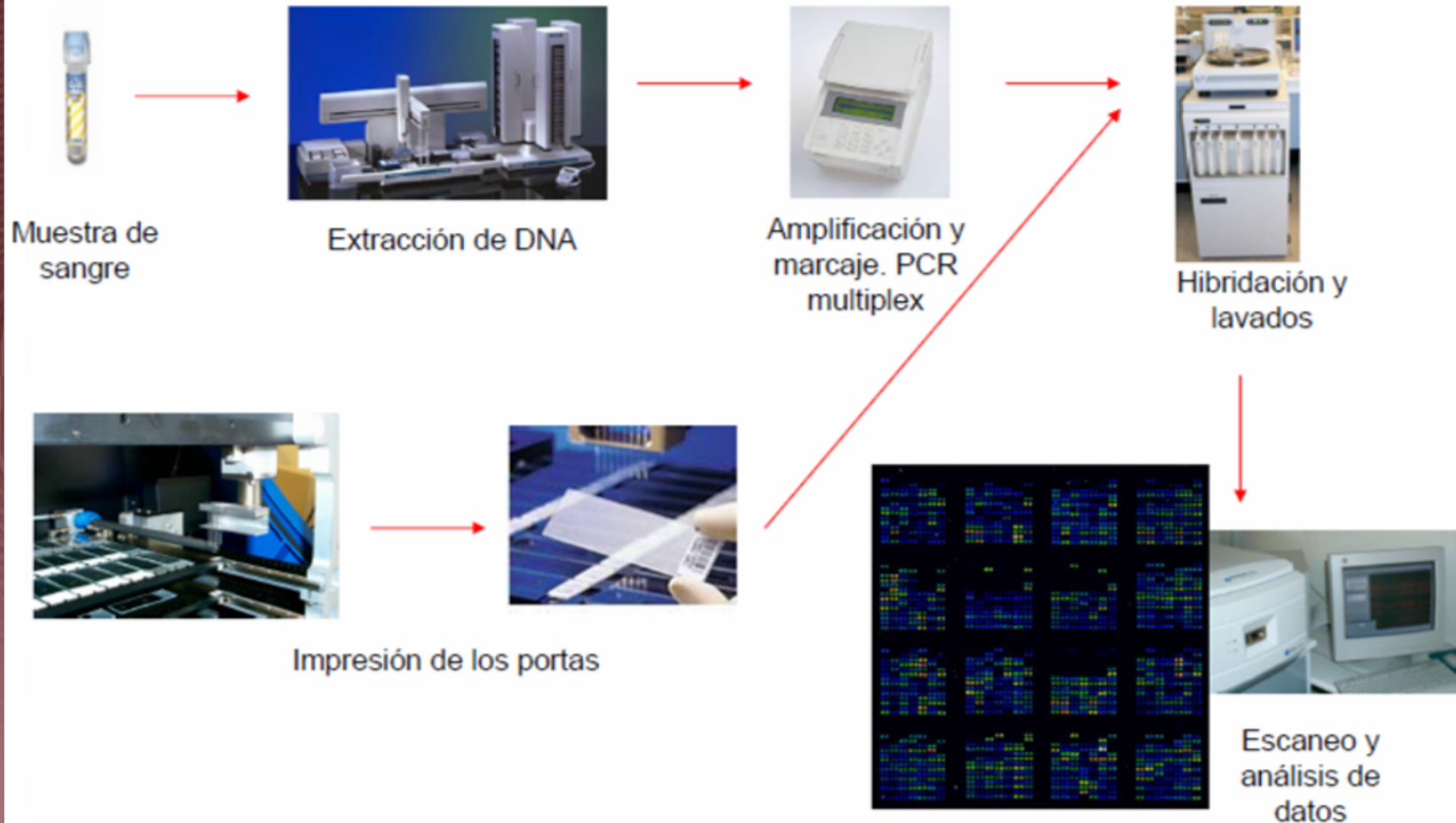


- Sondas de oligonucleotídeos em lâminas de vidro (Progenika)
- MPXI (ABO y RHD)
- MPXII (R HCE,MNS,DO,KEL,CO,JK,DI,FY)

Blood group (Symbol/Number)	Antigen involved
ABO (ABO/001)	ABO
RhD (RH/004)	RhD
RhCcEe (RH/004)	Rhc RhC <i>RHD</i> promotor <i>C^w</i> <i>C^x</i> RhE/Rhe VS VS/V
Kell (KEL/006)	K/k Kp ^a /Kp ^b Kp ^c Js ^a /Js ^b European Ko
Kidd (JK/009)	Jk ^a /Jk ^b Jk _{null}
Duffy (FY/008)	Fy ^a /Fy ^b FY-GATAmut Fy ^x
MNS (MNS/002)	M/N S/s
Diego (DI/010)	Di ^a /Di ^b



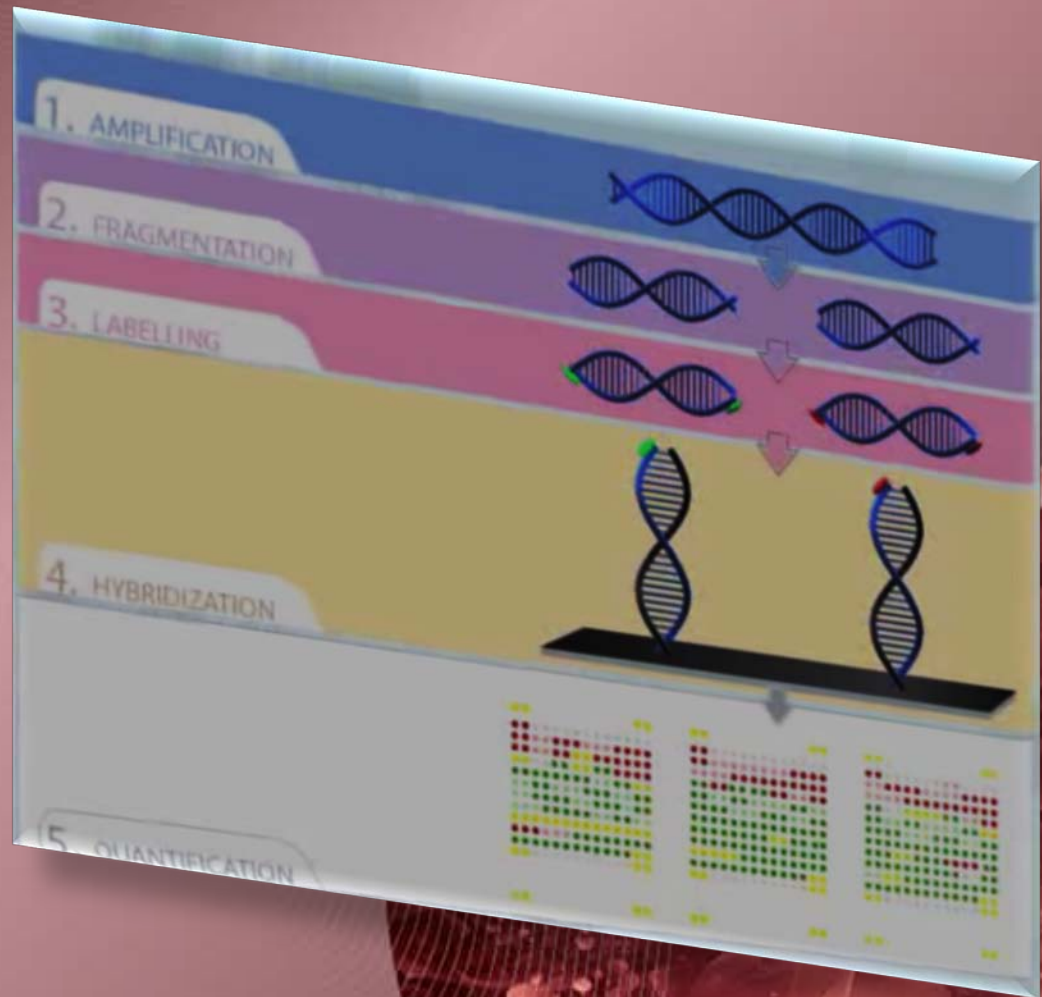
DNA array : ID- CORE



DNA array – ID CORE



- AMPLIFICAÇÃO
- FRAGMENTAÇÃO
- LEITURA (CLASSIFICAÇÃO)
- HIBRIDIZAÇÃO
- QUANTIFICAÇÃO





Análisis de datos:

996 Sample Code: CVX4_0031 Bloodgen Sample: 9 849 Date: 25-08-2006
File: X4_0031_4_R_180806_V4_AX_550_700.txt

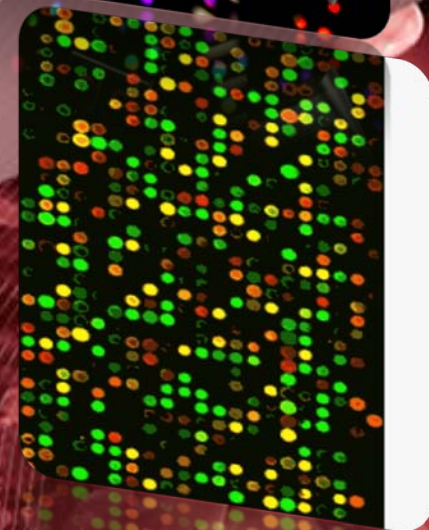
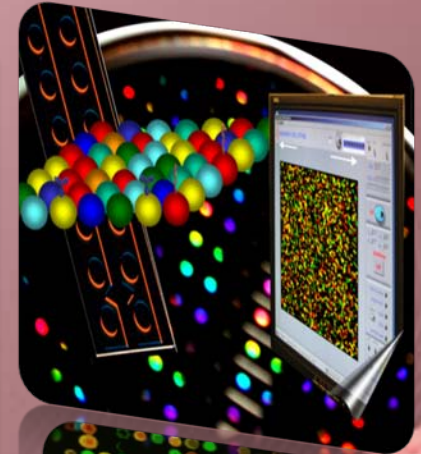
	Analyzed File	Serology Result	Coincident
ABO	O101v ==> O	O	Ok
RHD	weak D type 3 ==> "WEAK D"	"WEAK D"	Ok
RHCE Cx	NO Cx		
RHCE Cw	NO Cw		
RHCE Cc	Cc	Cc	Ok
RHCE r's	no r's		
RHCE Ee	ee	ee	Ok
RHCE 712ceAR	NO CEar,ek/BI		
RHCE 733VS	NO VS		
KELL Kk697*1Ser193	NO Kk697KEL*1Ser193		
KELL Kk	kk_K2K2	kk_K2K2	Ok
KELL KpA/KpB	KpBKpB_K4K4		
KELL KpC/Kmod	NO KpC,no Kmod-1		
KELL JsA/JsB	JsBJsB_K7K7		
KIDD JkA/JkB	JkBjKb_JK2JK2		
KIDD Jknull	NO Jknull		
DUFFY FyA/FyB	FyBFyB_FY2FY2		
DUFFY FyGATA/Fyx	NO FyGATA ,FyxFy(b+w)		
MN	MM		
Ss	ss		
U	NO U,IVS5		
GpMur	NO GP.Mur		
DIEGO DiA/DiB	DiBDiB_D12D12		
DOMBROCK DoA/DoB	DoBDoB_D02D02		
HLA-TON CoA/CoB	CoACoA_C01C01		

Perspectivas: Microarray



ADN array -Chips

- Gran número de muestras (buena plataforma para los donantes de sangre)
- PCR multiplex
- Análisis rápido y automático pós-PCR para numerosos polimorfismos de sangre
- Sistema cerrado para evitar la contaminación
- Análisis computarizado de los resultados
- Realiza las interpretaciones a partir de una base de datos





La tecnología microarray permite

- Resolver problemas complejos
- Proporcionan unidades compatibles
- Buscar donantes de sangre rara
- Mejorar la seguridad e la calidad de la sangre

Tecnología microarray:
el potencial de cambiar la medicina de transfusión



La tecnología microarray permite

**Compatibilidade
Perfeita**





**El futuro:
plataforma que puede
permitir que cada
individuo tenga su
genotipo **GLÓBULOS
ROJOS, PLAQUETAS
Y HLA** rápidamente
definido al nacimiento
(esta información lo
acompañará toda la
vida)**