



El genotipado en la Imunohematología: cuando y como

Carla Luana Dinardo , MD, PhD

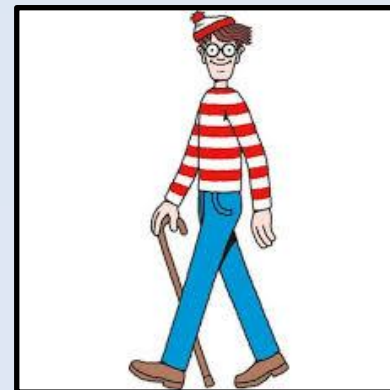
División de Inmunohematología

Fundación Pró-Sangre

Banco de Sangre de São Paulo

Pacientes
con necesidad
transfusional

Busqueda de
donantes
raros / poco
comunes



Porque genotipificar pacientes?

Pacientes
crónicamente
transfundidos

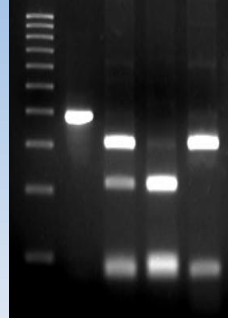
Auto
anticuerpos



Proteínas
variantes(RhD
y RhCE)

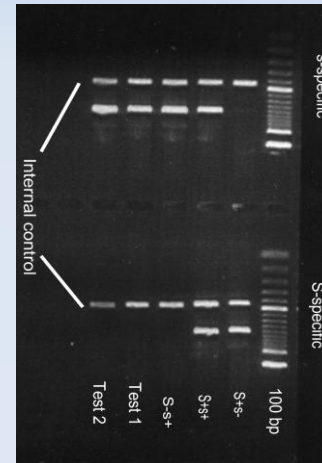
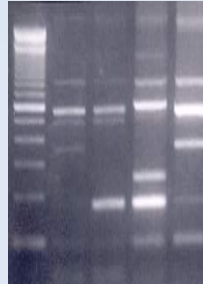
Falta de
disponibilidad
de antisueros
comerciales

- **PCR-RFLP**

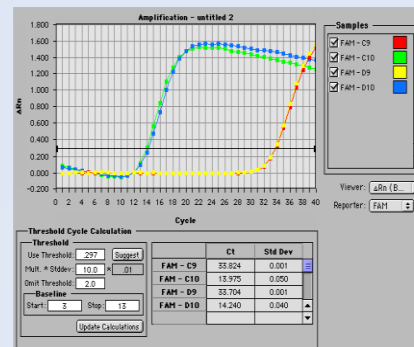


- **PCR específico de alelo (AS-PCR)**

- **PCR Multiplex**

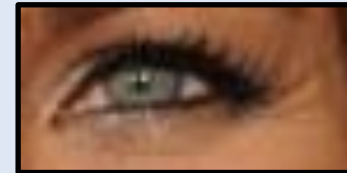


- **PCR en tiempo real**



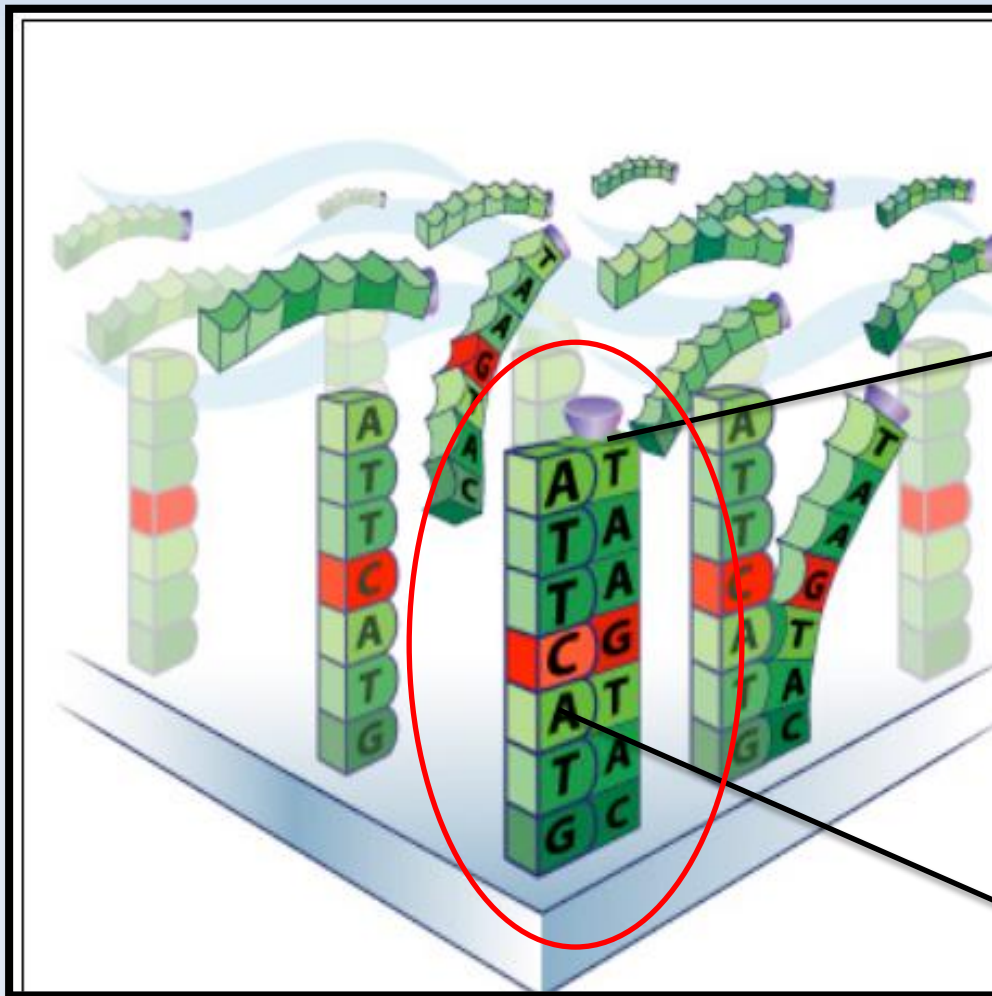
Permite la evaluación de pocos antígenos en cada reacción

Útil para la resolución puntual de casos inmunohematológicos



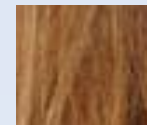
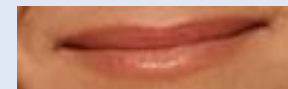
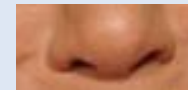
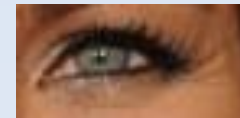
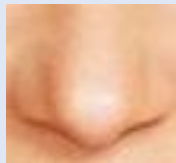
Técnica que requiere mucho tiempo para su aplicación en el genotipado de antígenos múltiples

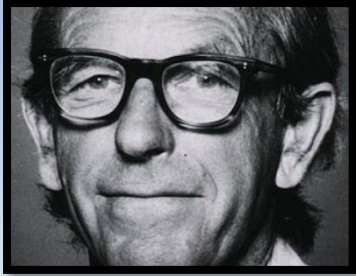
Determinación del fenotipado predicho de múltiples antígenos de GR



ADN
paciente

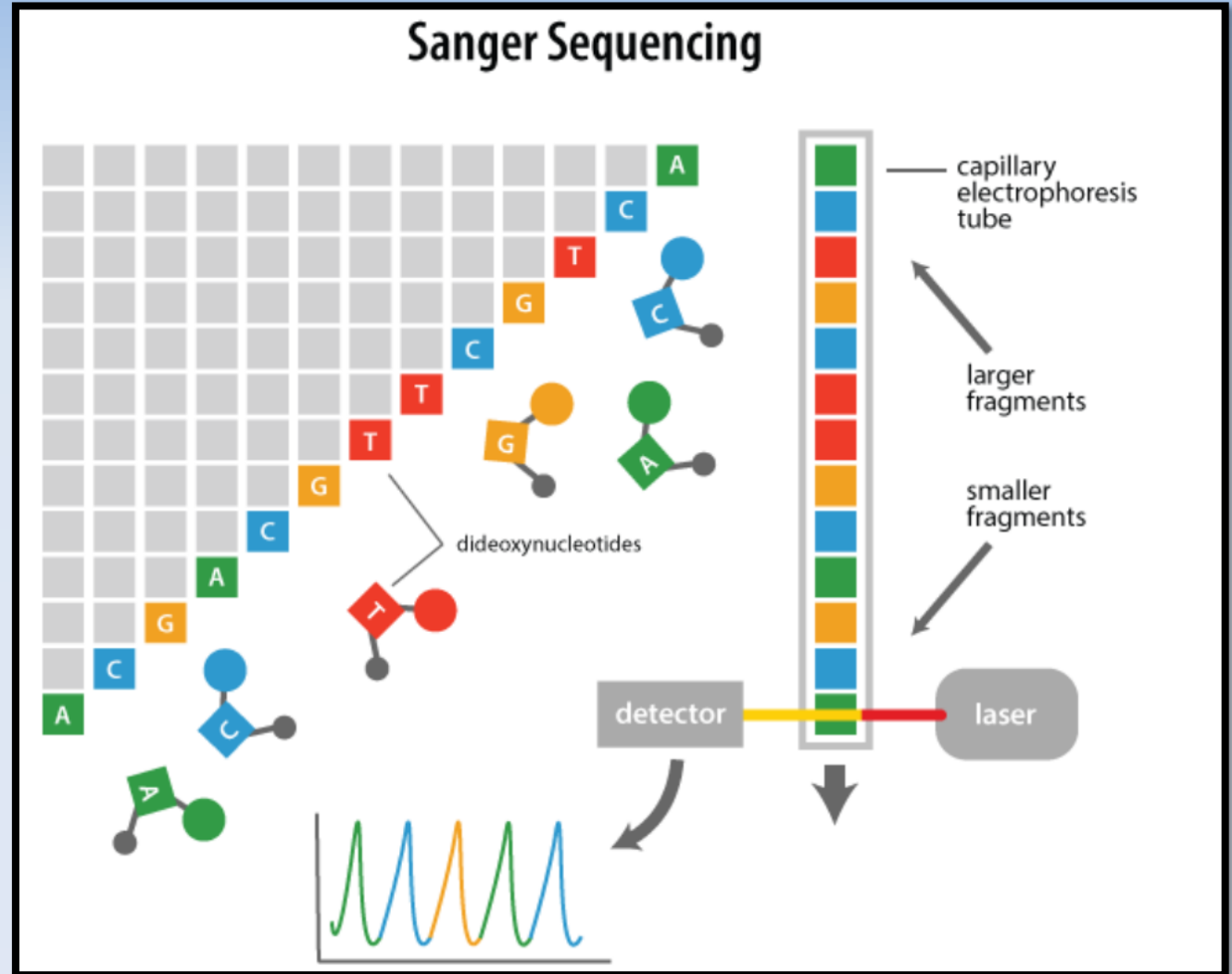
Oligonucleótido para
hibridación

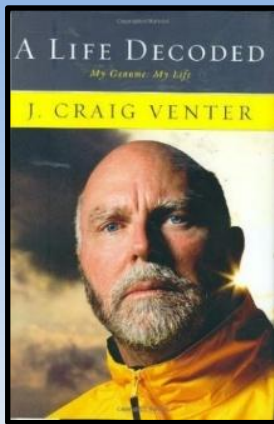




Uso de análogos de
nucleótidos con
capacidad
De finalizar
Cadena de ADN

Separación por
tamaño de la cadena
en electroforesis
capilar





Secuenciación de próxima generación (Next Generation Sequencing)

- Secuenciación por síntesis ("Secuenciación por síntesis")
- Procesamiento de millones de reacciones de secuenciación en paralelo
- Más rápido y económico que la secuenciación convencional



Que te parece ser la solución más
costo efectiva para el genotipado
de pacientes?



Las protagonistas



Caso 1

- Mujer, 56 anos
- Afrodescendente
- Transfusión previa por el nacimiento del primero hijo
- Neoplasia de pulmon
- Indicada cirugía curativa



Caso 1

- Tipaje: A+ (débil)

	Anti-A	Anti-B	Anti-D	Control	GRA	GRB
Muestra	4+	0	2+	0	0	4+

- RAI: positivo

	GR1 (R1R1)	GR2 (R2R2)	GR3 (R1R2)
Muestra	3+	4+	3+

Anti-e like

Antiuerpo contra antígeno de alta frecuencia

Diagrama	Rh							KELL						Duffy		KIDD		Lewis		MNS				P	Lutheran		Resultado	
Doador	D	C	E	c	e	f	Cw	K	k	Kpa	Kpb	Jsa	Jsb	Fya	Fyb	Jka	Jkb	Lea	Leb	M	N	S	s	P1	Lua	Lub	NT	Pap
1	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	NT	NT	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	3	4
2	+	+	0	0	+	0	0	+	+	0	+	NT	NT	0	+	0	+	0	0	+	+	+	+	0	0	+	3	4
3	+	0	+	+	0	0	0	0	+	0	+	NT	NT	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	2	4
4	0	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	NT	NT	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	3	4
5	0	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	NT	NT	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	3	4
6	0	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	NT	NT	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	0	+	3	4
7	0	0	0	+	+	+	0	+	+	+	+	NT	NT	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	3	4
8	0	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	NT	NT	+	+	+	0	+	0	0	+	+	+	+	0	+	3	4
9	0	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	NT	NT	+	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	3	4
10	+	+	+	0	+	0	0	0	+	0	+	NT	NT	0	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	3	4
11	+	0	+	+	0	+	0	0	+	0	+	NT	NT	0	+	+	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	2	4
12	+	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	NT	NT	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	3	4

R0r (C-, c+, E-, e+), Fy(a-b+); S-s+; Jk(a+b+)

AT:Negativo

Caso 1 – Y ahora???

- a) Hacer pruebas de compatibilidade hasta tener um resultado negativo
- b) Transfundir GRs de tipo R2R2
- c) El resultado es sugestivo de variante de RH
- d) Cancelar la cirurgia y indicar quimioterapia



Caso 1 – Y ahora???

- a) Hacer pruebas de compatibilidade hasta tener um resultado negativo
- b) Transfundir GRs de tipo R2R2
- c) El resultado es sugestivo de variante de RH**
- d) Cancelar la cirurgia y indicar quimioterapia



Caso 1- Genotipado

- DNA-array (resultado en el dia siguiente)
 - $RHD^*DAR/^*DAR$
 - $RHCE^*ceAR/^*ceAR$
- Predicción fenotípica
 - D parcial
 - c y e parciales
 - hrS y Hr negativo

Caso 2

- 24 anos, Caucasiona, A+
- Falencia del hígado
- Indicación de transplante



	GR1	GR2	GR3	AT	24°C
Muestra	3+	3+	3+	0	2+

	GR1	GR2	GR3	AT
Muestra 4C	3+	3+	3+	0

Puedes seguir com la serologia?

- A) Si, porque tengo anti-sueros y GR raros
- B) No, tengo solo el kit más básico de anti-sueros y GR raros
- C) No, solo tengo los reactivos comerciales

Caso 2

- Pruebas sorológicas adicionales

	GR Vel-	GR Bombay
Muestra	0	3+

- Prueba molecular em real time PCR
 - Predicción Vel negativo



Caso 3



- 33 años, Lupus diagnostico reciente
- Hb 2g/dL; Ht 8%
- Embarazada 6 semanas
 - Fertilización *in vitro*

Caso 3



- 33 años, Lupus diagnostico reciente
- Hb 2g/dL; Ht 8%
- Embarazada 6 semanas
 - Fertilización *in vitro*

	GR1	GR2	GR3	AT
Muestra	4+	4+	4+	4+

Caso 2

- Aloadsorción con 3 alíquotas de GR com fenótipos distintos tratados com ZZAP
 - Después de 3 repeticiones

	Suero Post- adsorción 1	Suero Post- adsorción 2	Suero Post- adsorción 3
Muestra	4+	4+	4+



El genotipado puede ayudar?



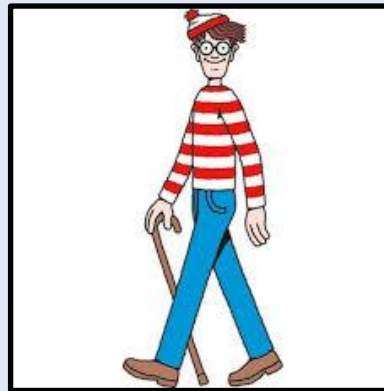
Caso 3

- Genotipado por el DNA-array
 - Transfusión de GRs compatibles con el fenotipado
- R1R1; K-; Jka(a-b+); Fy(a-b+); S-s+
 - Sin hemólisis
- Anti-c identificado
 - Después de 1 mês de corticoesteroides

Porque genotipificar los donantes?

Falta de
disponibilidad de
antisueros
comerciales

Búsqueda de
donantes
raros



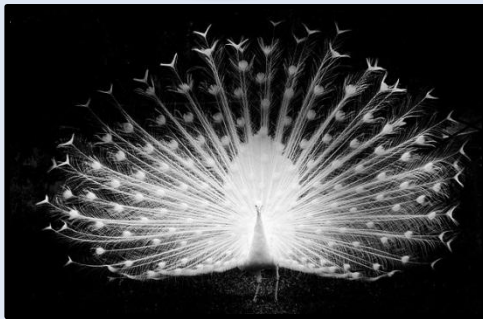
Proteínas
variantes(RhD
y RhCE)

¿Qué es raro?

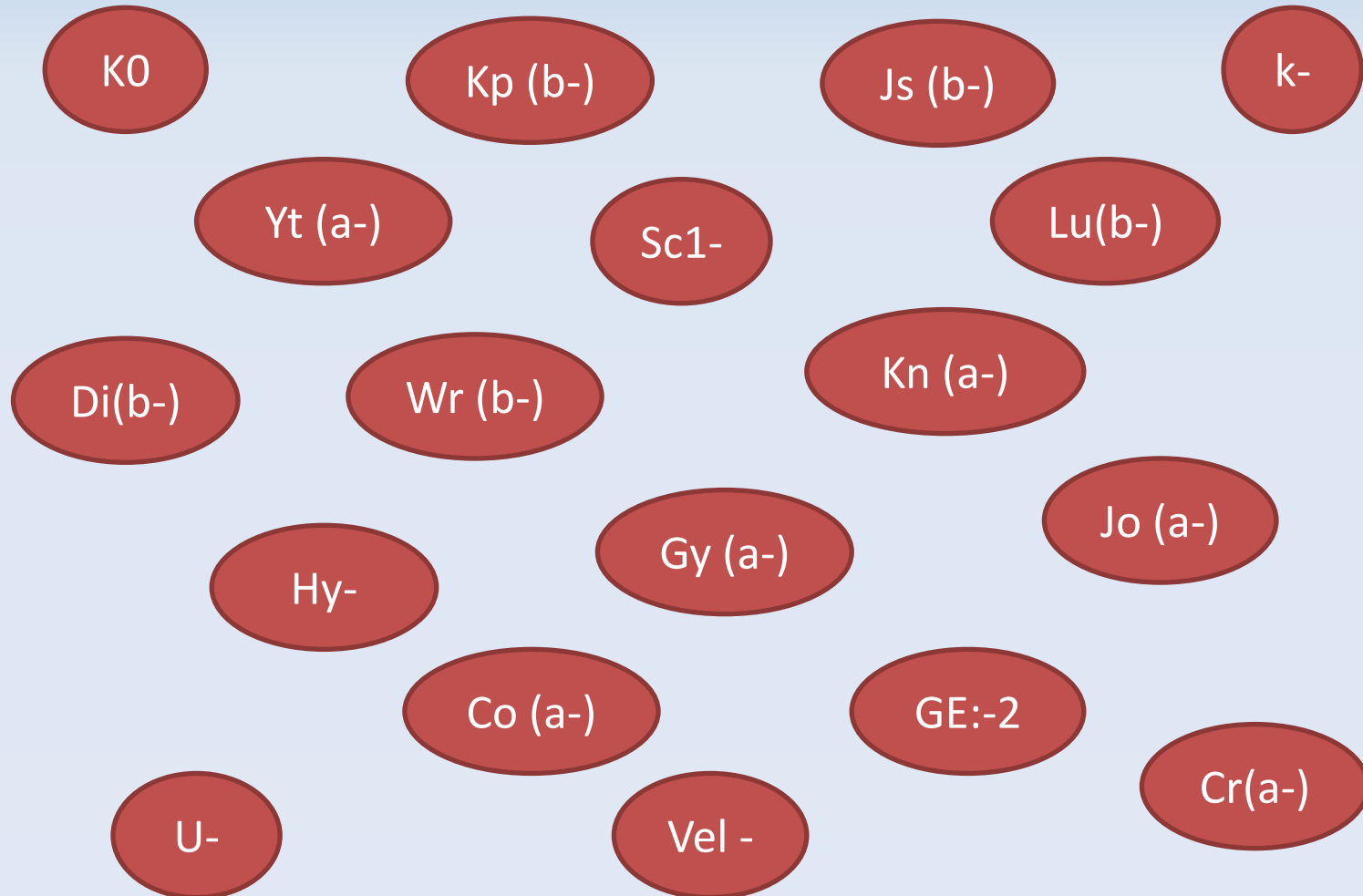


Ausencia de
antígeno de alta
frecuencia
poblacional

Suma de
múltiples
fenotipos
inusuales



Ausencia de antígeno poblacional de alta frecuencia



Ausencia de antígeno poblacional de alta frecuencia

Riesgo transfusional

K0

Js (b-)

k-

Kp (b-)

Di(b-)

U-

Vel -

Hy -

GE:-2

Jo (a-)

Riesgo transfusional variable

Yt (a-)

Sc1-

Lu(b-)

Co (a-)

Wr (b-)

Kn (a-)

Gy (a-)

Cr(a-)



Hro, Hr, U, Js^b,
Hy, En^a

Ge



Di^b

Di^b, Jr^a



Jk3

Yt^a



Estrategías de Búsqueda

Fenotipado



Biología molecular

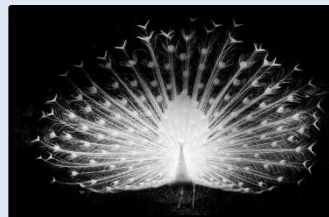
Microarray



PCR convencional

SNPshot

PCR en tiempo real



Secuenciación

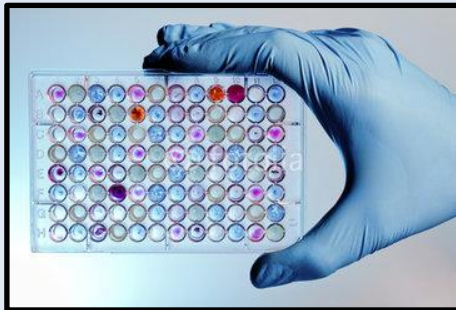


Métodos Serológicos

Suero de donante o pacientes sensibilizados

Antisueros comerciales cuando disponibles

Microplaca



Gel



Tubo



Métodos Serológicos

Ventajas

- ✓ Bajo costo
- ✓ Libre de extracción de ADN



Desventajas

- ✓ Disponibilidad baja de sueros humanos
- ✓ Indisponibilidad de sueros comerciales
- ✓ Resultados falsos negativos
U, Vel, k
- ✓ Número donantes probado limitado

Métodos DNA-array

Ventajas

- ✓ Múltiple antígenos y donantes por ensayo
- ✓ Independiente de los antisueros

5000
donantes



3 k-; 2 Co(a-b+)
1 Kp(a+b-) 9 Yt (a-b+)
6 Js (a+b -) 6 Kn (a-b+)
5 Lu(a+b -)
1 Di(a+b -)
1 Joa -

Cual es la mejor estrategias de busqueda de donantes raros?

- a) Genotipado
- b) Fenotipado
- c) Los dos juntos



Fenotipos de ascendencia africana

Etnia autodeclarada



- R0r (C-,E-) + Jk (b-) + Fy (b-)
- Fy (a-b -)
- S-s-

Variantes
RHCE

Hy- , Jo (a-);U-; Js (b-)

Effectiveness of strategies to screen for blood donors with *RH* variants in a mixed population

[Fabio Augusto Abreu de Almeida](#) • [Marcia Regina Dezan](#) • [Valeria Brito Oliveira](#) • ... [Vanderson Rocha](#) • [Alfredo Mendrone-Júnior](#) • [Carla Luana Dinardo](#)   • [Show all authors](#)

Published: January 14, 2020 • DOI: <https://doi.org/10.1016/j.transci.2020.102720> •



- 2.500 donantes
- 217 R0 o R1 se autoidentificaron como negros
- 12 donantes hrS - o hrB -
- ~70% con fenotipo Duffy nulo → Fy (a-b -)

Caso 1

- Mujer, 56 anos
- Afrodescendente
- Anti-hrS y anti-Hr
- 2 donantes compatibles
- Cirugía exitosa



Fenotipos diversos

Selección basada en criterios
fenotipo de
baja frecuencia:

Kp (a+)

K+

Di(a+)

Lu(a+)



Detección con
antisueros

Anti-Vel

Anti-Ge2

Anti-Lub

Anti-Yta

Confirmación
Molecular

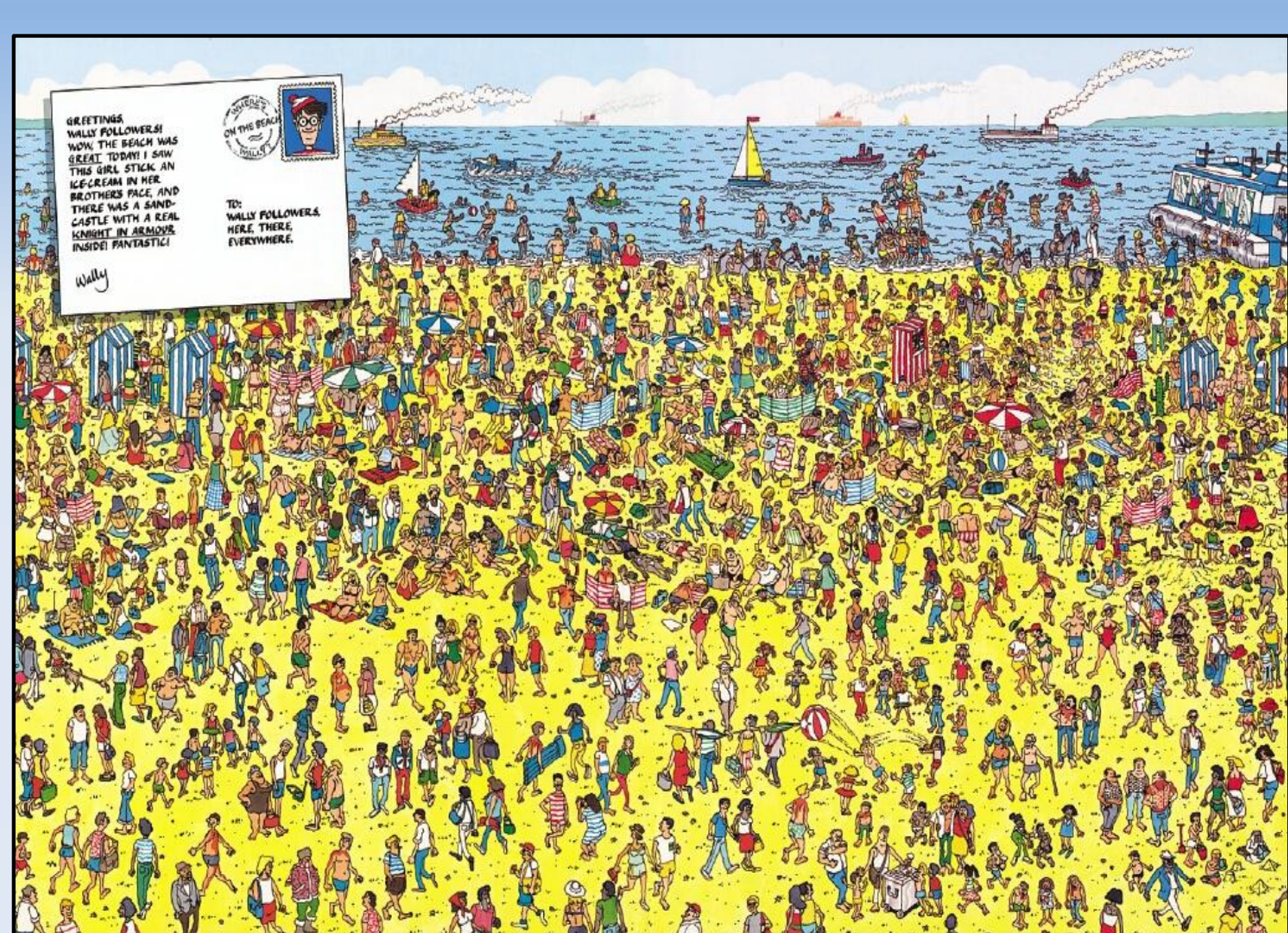


GREETINGS,
WALLY FOLLOWERS!
WOW, THE BEACH WAS
GREAT TODAY! I SAW
THIS GIRL STICK AN
ICE-CREAM IN HER
BROTHER'S FACE, AND
THERE WAS A SAND-
CASTLE WITH A REAL
KNIGHT IN ARMOR
INSIDE! FANTASTIC!

Wally



TO:
WALLY FOLLOWERS.
HERE, THERE,
EVERYWHERE.

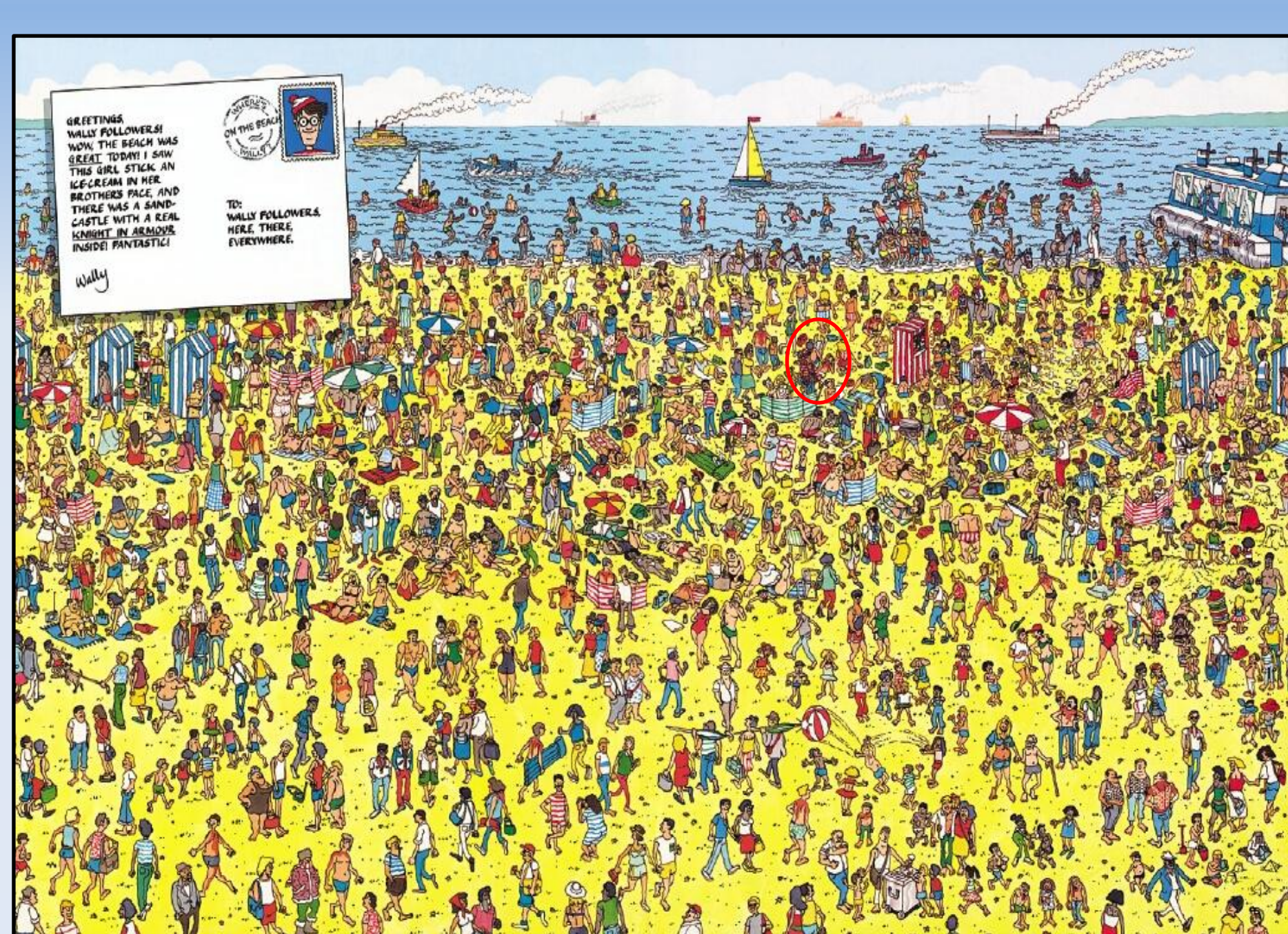


GREETINGS,
WALLY FOLLOWERS!
NOW, THE BEACH WAS
GREAT TODAY! I SAW
THIS GIRL STICK AN
ICE-CREAM IN HER
BROTHER'S FACE, AND
THERE WAS A SAND-
CASTLE WITH A REAL
KNIGHT IN ARMOR
INSIDE! FANTASTIC!

Wally

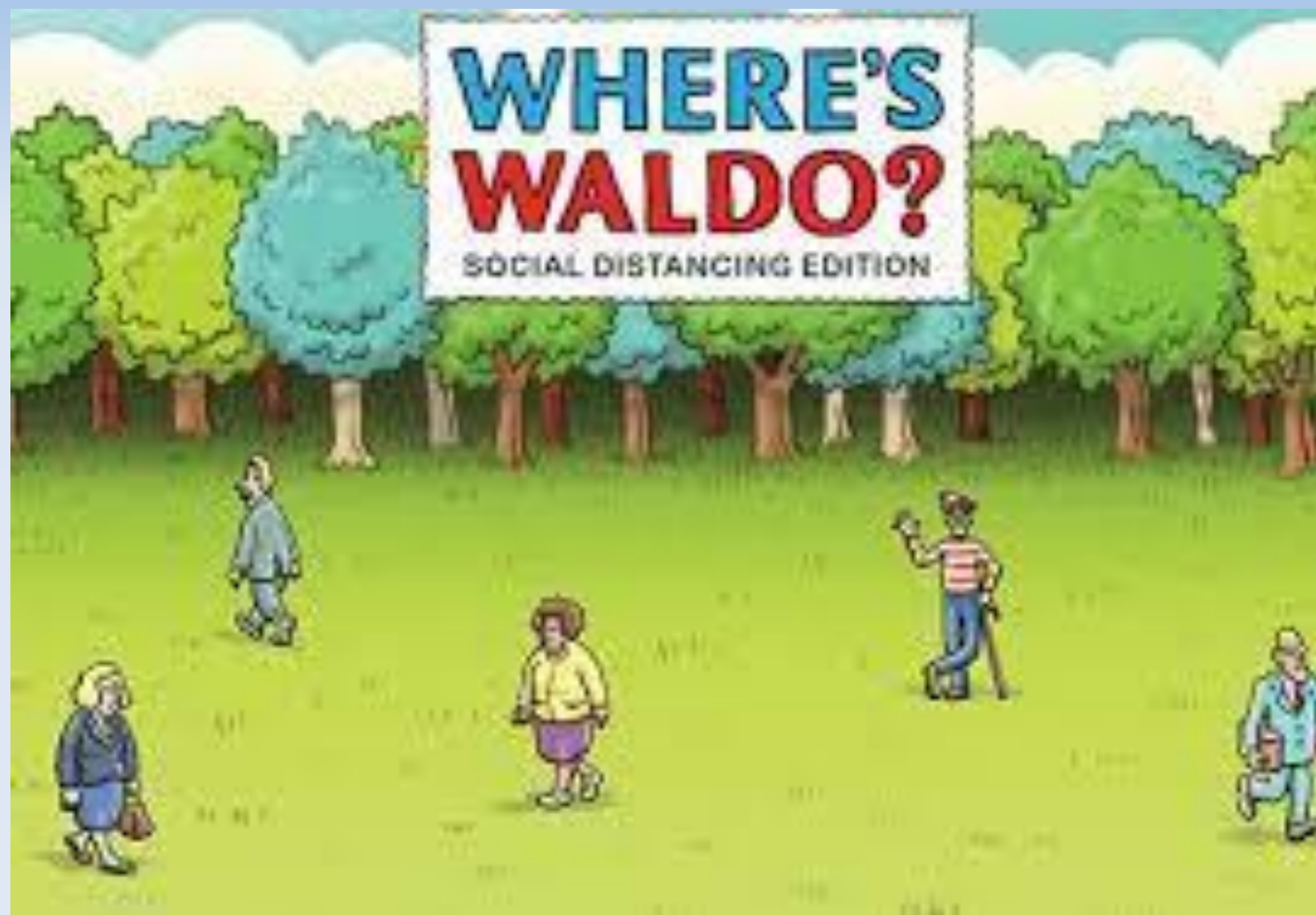


TO:
WALLY FOLLOWERS.
HERE, THERE,
EVERYWHERE.



WHERE'S WALDO?

SOCIAL DISTANCING EDITION

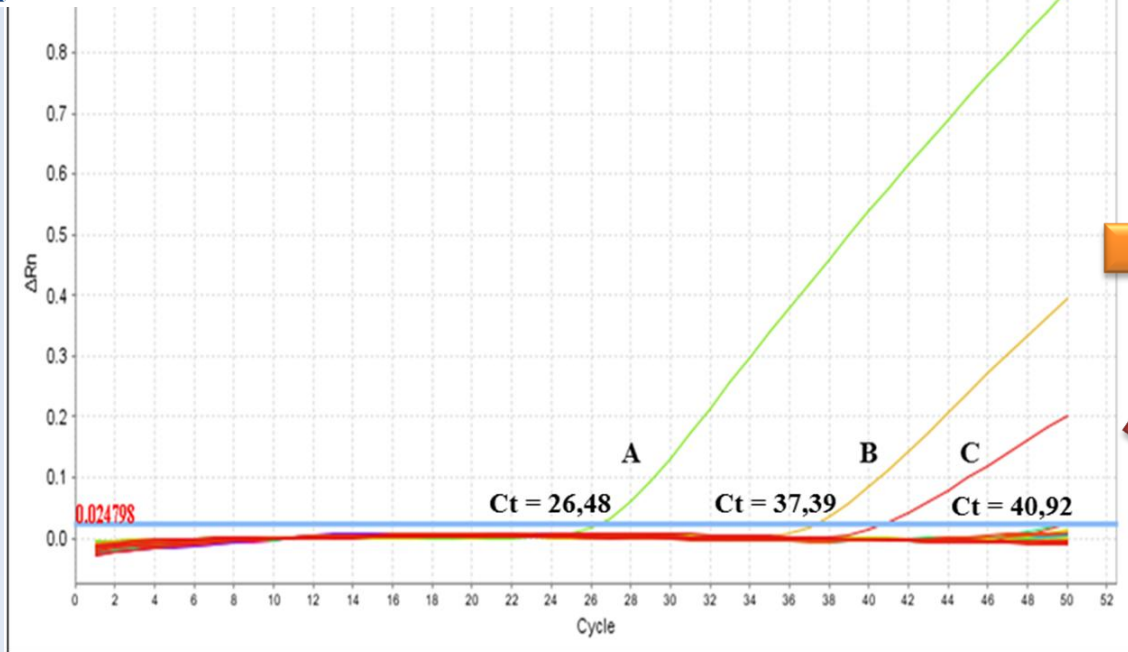
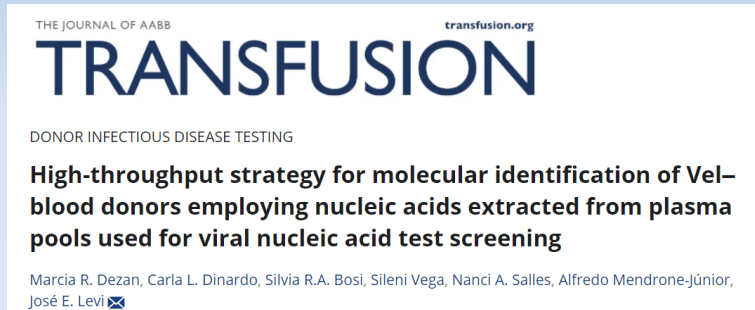


PCR en tiempo real



¿Por qué no buscar la ausencia
del antígeno de alta frecuencia en po
De donantes?

PCR en tiempo real → Vel



ADN g Vel -

ADN plasma
Vel -

ADN plasmático
Grupo de 6 donante
1 Vel -

Genotipagem em tempo real usada para detectar a deleção de 17 nt no éxon 3 do *SMIM1*.

A. gDNA Vel- B. DNA de plasma Vel- C. DNA de pool de plasma com 1 amostra Vel-.

Caso 2

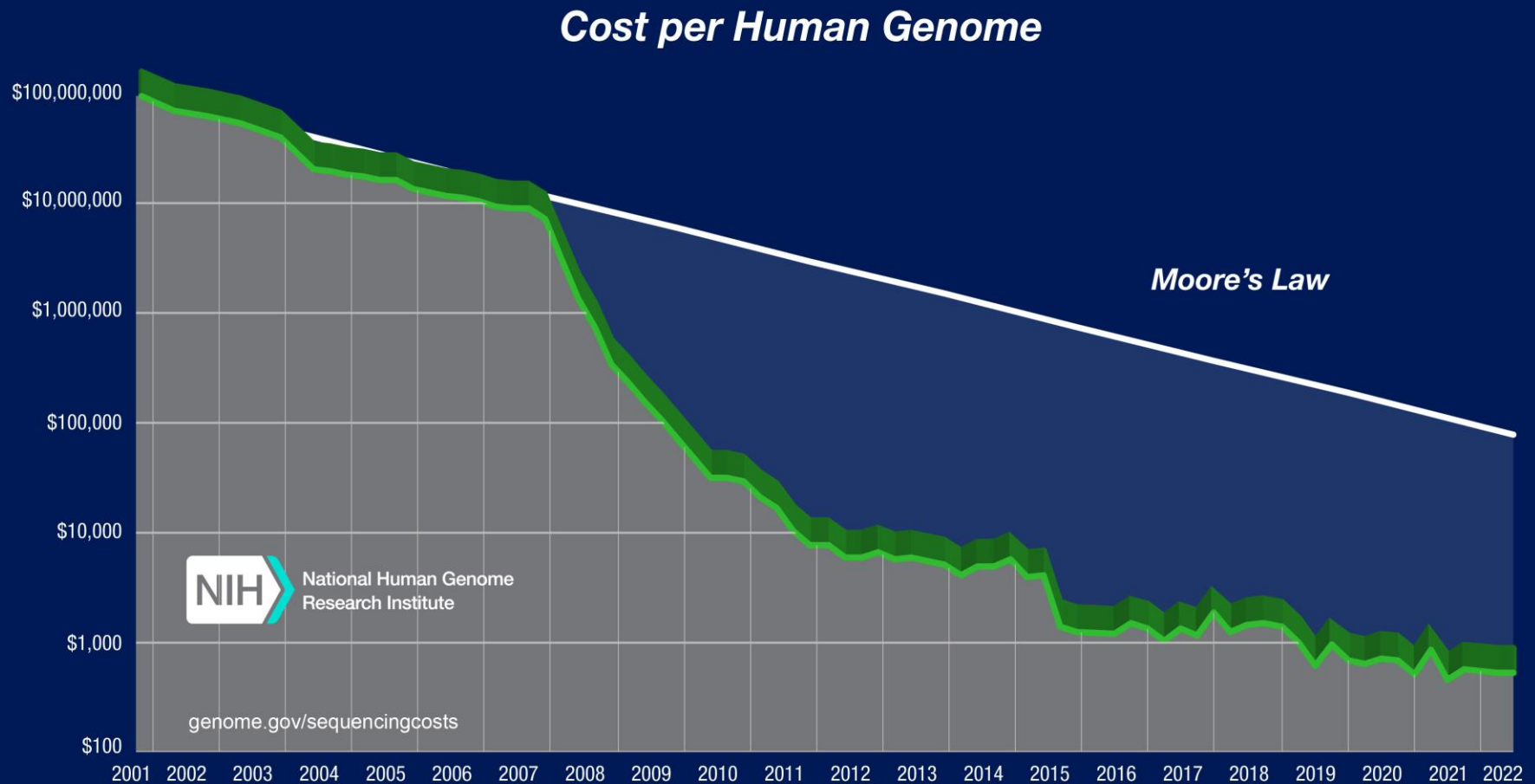
- 24 anos, Caucasiona, A+
- Falencia del hígado
- Indicación de transplante



- Donante localizada
- Transplante exitoso



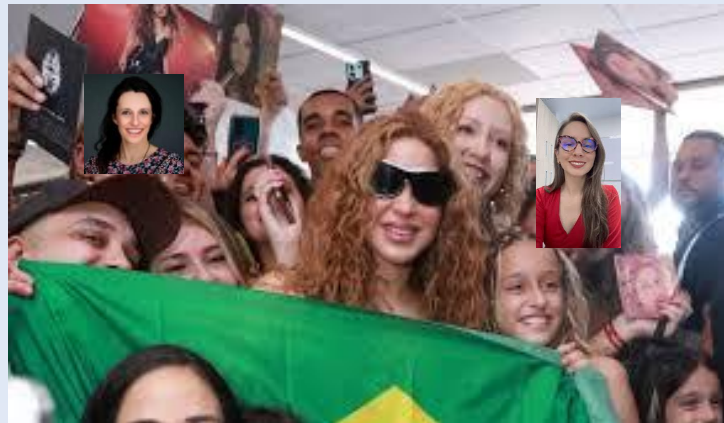
Secuenciación del genoma humano



Conclusiones

Métodos molecular son herramientas importantes para la resolución de casos difíciles y para la búsqueda donantes raros

Indicación precisa y em combinación com serologia llevan a resultados costo-efectivos



Con el genotipado

GRACIAS!!!!!!



caludinardo@gmail.com