

45°

**Convegno Nazionale**  
**di Studi di Medicina Trasfusionale**

Rimini | 29-31 maggio 2024



**Tipizzazione HLA con tecnologia in Next Generation Sequencing**

*Valentina Cappuzzo*

*U.O.S. HLA*

*A.O. Ospedali Riuniti «Villa Sofia-Cervello»*

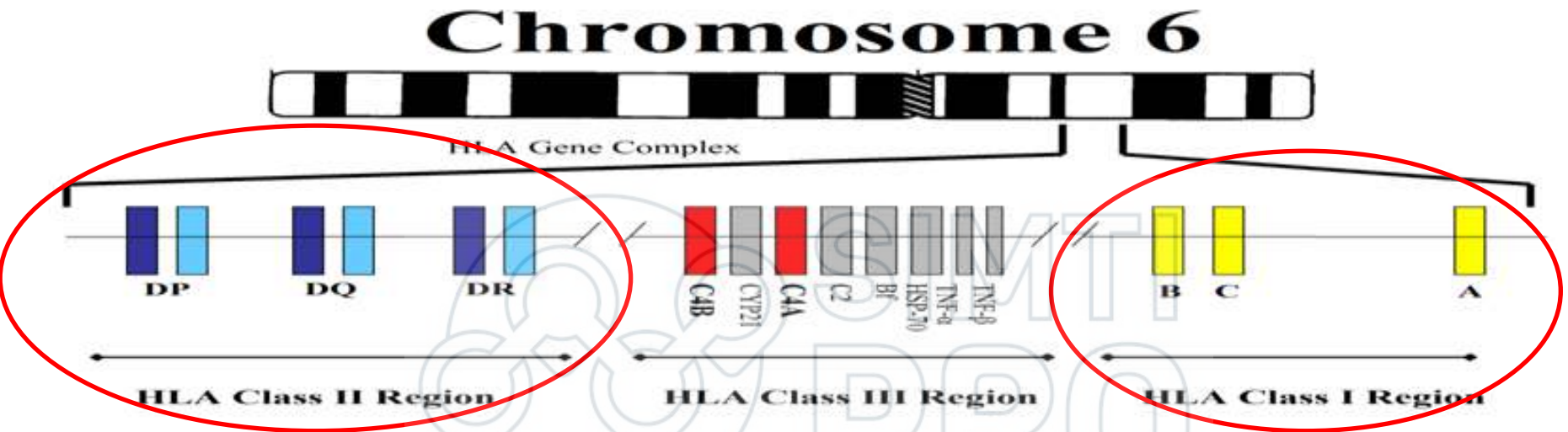
*Palermo*

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.*



# Human Leukocyte Antigen HLA



**Geni altamente polimorfici:** codificano antigeni specifici per ciascun individuo

**Risposta Immunitaria:** presentazione di peptidi derivati da antigeni self o non self ai linfociti T

**Trapianti:** bersaglio di linfociti T alloreattivi e anticorpi IgG anti-HLA e quindi responsabili delle complicanze immunologiche post-trapianto (Rigetto e GvHD)

# Polimorfismo HLA



## IPD-IMGT/HLA

[Overview](#)[IMGT/HLA](#)[KIR](#)[MHC](#)[NHKIR](#)[HPA](#)[ESTDAB](#)

[IPD](#) / [IMGT/HLA](#) / [ABOUT](#) / [STATISTICS](#)

**IMGT/HLA 3.55 - 01/2024**

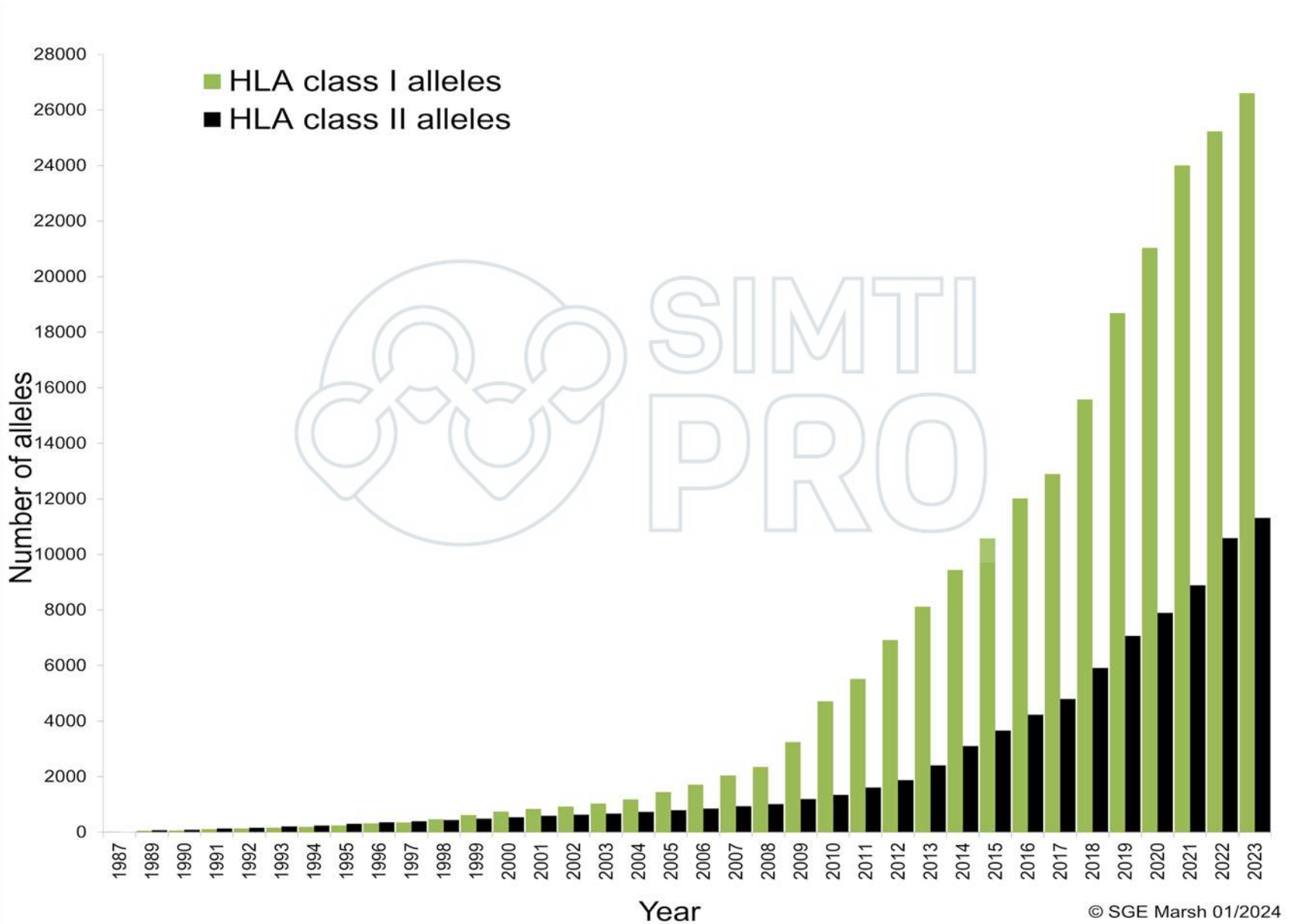
**TOTALE**

HLA class I								
Gene	A	B	C	E	F	G		
Alleles	8098	9656	8084	352	91	158	HLA class I alleles	26610
Proteins	4741	5745	4470	140	17	48	HLA class II alleles	11398
Nulls	420	339	362	10	2	6	HLA alleles	38008

HLA class II									
Gene	DRA	DRB	DQA1	DQA2	DQB1	DQB2	DPA1	DPA2	DPB1
Alleles	67	4581	722	42	2510	41	639	6	2486
Proteins	15	3019	351	11	1524	9	311	0	1447
Nulls	0	200	21	0	111	1	26	0	130

<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/about/statistics/>

# Polimorfismo HLA



# HLA e Trapianti

Diversità HLA = Alloreattività



**Complicanze immunologiche post-trapianto**

## Trapianto d'organo

1.

Host Vs Donor



Rigetto

(Iperacuto; Acuto; Cronico)

## Trapianto di Cellule Staminali Emopoietiche

1.

Host Vs Donor



Rigetto

(Engraftment Failure)

2.

Donor Vs Host



Malattia del Trapianto contro l'ospite  
Graft Versus Host Disease  
GvHD Acuta e Cronica

# Trapianto di CSE Allogeneico

**Cellule trapiantate immunocompetenti**



**Graft versus Host Disease  
GvHD**

Risposta immunitaria contro le cellule dell'organismo ospite tanto più grave quanto maggiori sono le differenze che esistono fra le caratteristiche HLA del donatore e quelle del ricevente.



**Fonte ideale di cellule staminali ematopoietiche**

Un **donatore** che abbia le **stesse caratteristiche HLA** del **ricevente**, o quantomeno, il più possibili uguali.

# Probabilità di trovare un donatore HLA compatibile

Due fratelli hanno le seguenti probabilità:

- 25% di avere lo stesso genotipo
- 50% di avere un solo aplotipo uguale (aploidentico)
- 25% di essere completamente diversi

**La maggior parte dei pazienti che necessitano del TMO, circa il 75%, non possono reperire il donatore HLA identico tra i familiari**



**DONATORE NON APPARENTATO COMPATIBILE**  
**Matched Unrelated Donor (MUD)**  
**Cord Blood Unit (CBU)**

**FAMILIARE APLOIDENTICO**



# Trapianto di CSE Allogeneico

## Possibili Donatori di CSE

1. Donatore Familiare HLA Identico
2. Donatore non consanguineo HLA compatibile (Matched Unrelated Donor MUD)
3. Donatore Familiare HLA Aploidentico

# Compatibilità HLA e trapianti CSE



Transplantation and Cellular Therapy

journal homepage: [www.tctjournal.org](http://www.tctjournal.org)



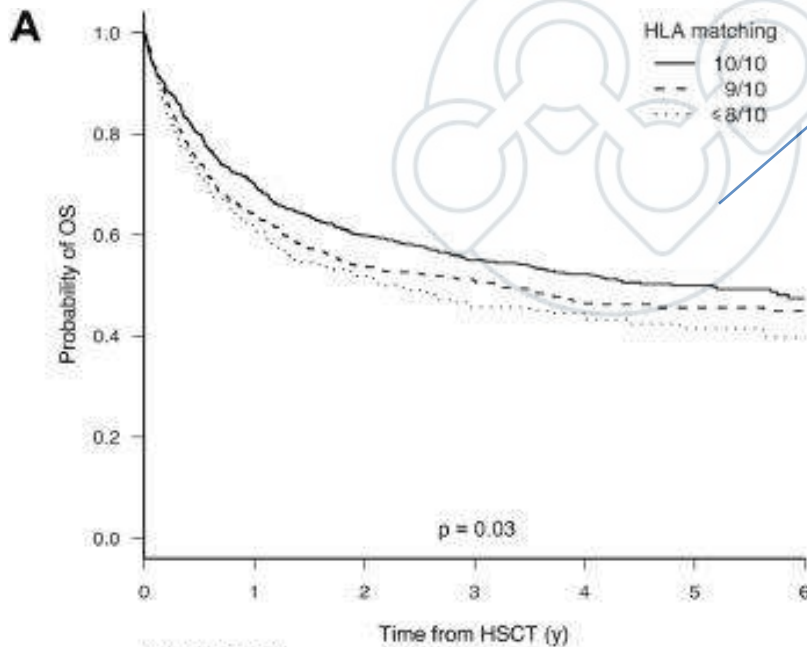
Full Length Article  
Allogeneic – Adult

Allelic HLA Matching and Pair Origin Are Favorable Prognostic Factors for Unrelated Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Neoplastic Hematologic Diseases: An Italian Analysis by the Gruppo Italiano Trapianto di Cellule Staminali e Terapie Cellulari, Italian Bone Marrow Donor Registry, and Associazione Italiana di Immunogenetica e Biologia dei Trapianti

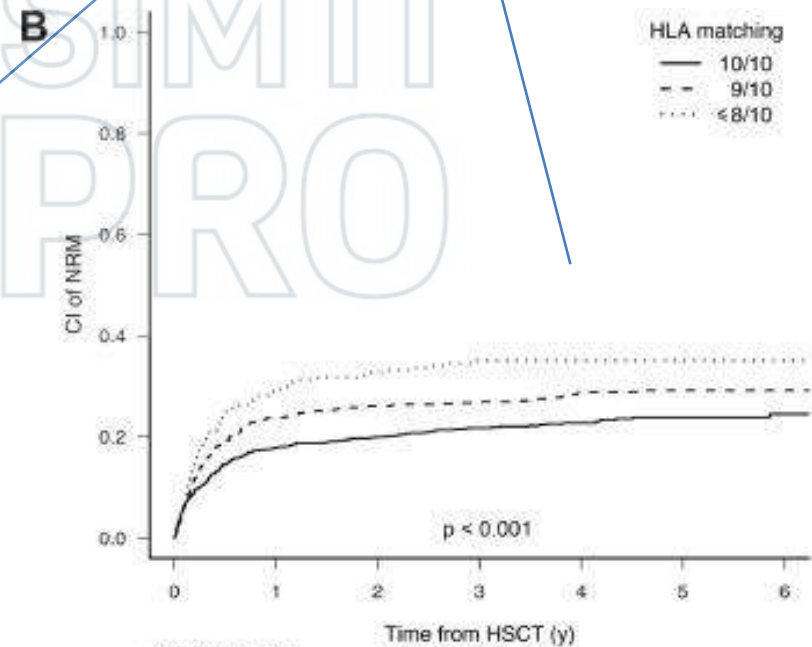


Alessandra Picardi<sup>a,b,\*</sup>, Nicoletta Sacchi<sup>c</sup>, Valeria Miotti<sup>d,e</sup>, Francesca Lorentino<sup>f</sup>, Elena Oldani<sup>g</sup>,

9/10 and 8/10 worse OS (P = .04 and .007) and worse NRM (P = .007 and P < .0001)



	Number at risk							
	0	1	2	3	4	5	6	
10/10	890	616	514	415	281	156	62	
9/10	677	428	350	294	199	118	50	
≤8/10	221	135	113	93	69	38	18	



	Number at risk							
	0	1	2	3	4	5	6	
10/10	890	509	421	329	217	118	45	
9/10	677	363	292	237	164	96	41	
≤8/10	221	117	94	75	53	30	12	

# Compatibilità HLA e trapianti organi

Received: 1 November 2018 | Revised: 18 December 2018 | Accepted: 3 January 2019

DOI: 10.1111/ajt.15258

**ORIGINAL ARTICLE**

AJT

## Assessing the utilization of high-resolution 2-field HLA typing in solid organ transplantation

Yanping Huang<sup>1</sup> | Anh Dinh<sup>1</sup> | Steven Heron<sup>1</sup> | Allison Gasiewski<sup>1</sup> | Carolina Kneib<sup>1</sup> | Hilary Mehler<sup>1</sup> | Michael T. Mignogno<sup>1</sup> | Ryan Morlen<sup>1</sup> | Larissa Slavich<sup>1</sup> | Ethan Kentzel<sup>1</sup> | Edward C. Frackelton<sup>1</sup> | Jamie L. Duke<sup>1</sup> | Deborah Ferriola<sup>1</sup> | Timothy Mosbrugger<sup>1</sup> | Olga A. Timofeeva<sup>3</sup> | Steven S. Geier<sup>3</sup> | Dimitri Monos<sup>1,2</sup>

High Resolution-2F typing was highly instructive or necessary in 41% (156/385) of the cases.

Several pre- and posttransplant scenarios were identified as being better served by HR-2F typing.

# Tipizzazione HLA ad alta risoluzione



## Per quali campioni?

- Studi Familiari Tx CSE
- Aploidentici Tx CSE
- Attivazioni MUD CSE
- Donatori MUD TC CSE
- 1° Inserimento IBMDR
- Studi per trapianto d'organo

Numero elevato di campioni per seduta

Quale metodo utilizzare?



Un metodo che consenta di tipizzare ad alta risoluzione molti campioni in un'unica corsa, massimizzando l'efficienza e riducendo il costo per campione.

# Metodi di tipizzazione HLA tradizionali

## Sierologia:

CDC (Citotossicità complemento dipendente)

## Molecolare:

A. PCR-SSP

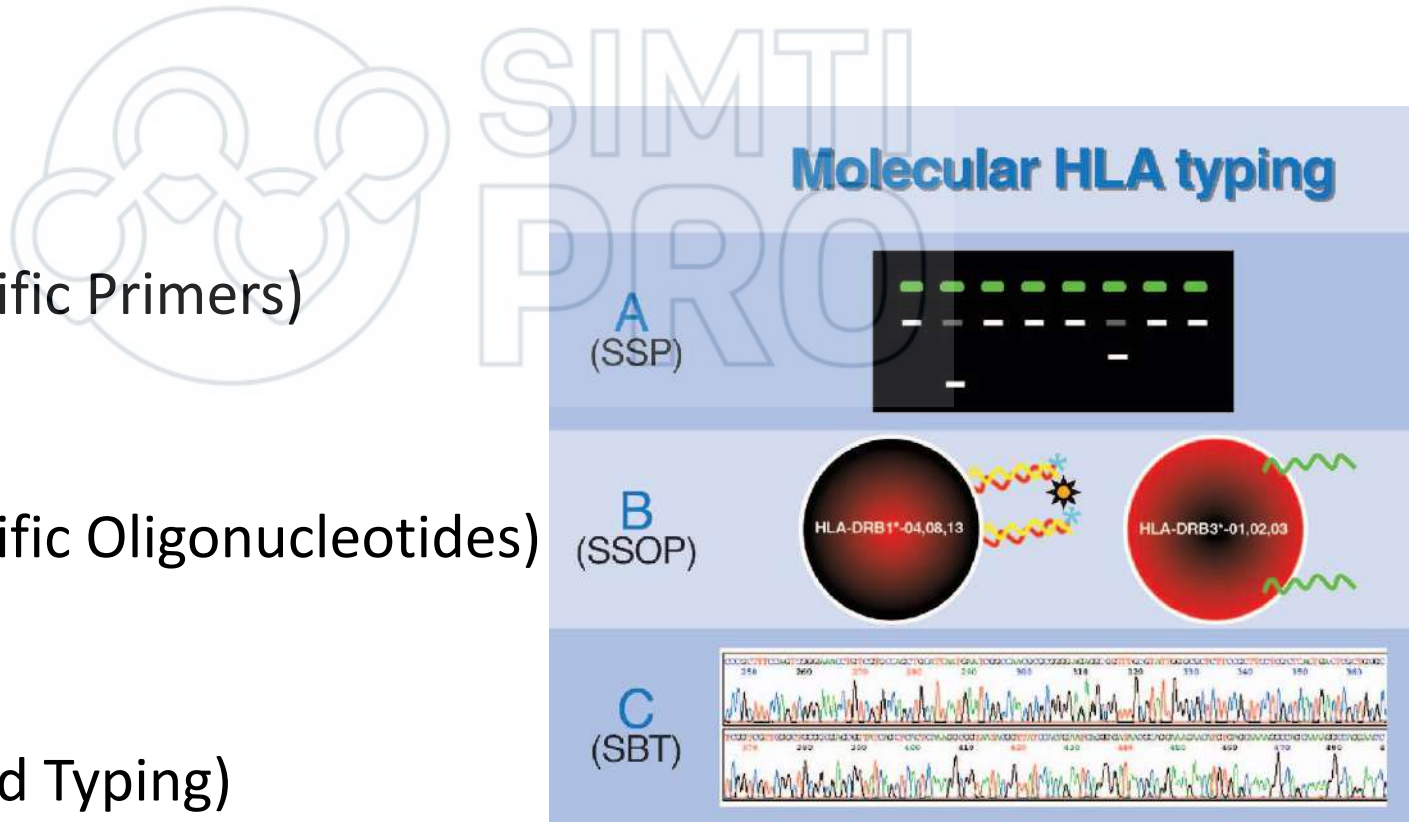
(Sequence Specific Primers)

B. PCR-SSO

(Sequence Specific Oligonucleotides)

C. PCR-SBT

(Sequence Based Typing)



# Limiti dei metodi di tipizzazione HLA tradizionali

## PCR-SSP

- 1 test per ogni singolo allele;
- Non è possibile testare molti campioni per seduta;
- Difficile aggiornamento dei primers;
- Ambiguità;
- Nuovi alleli non rilevabili.

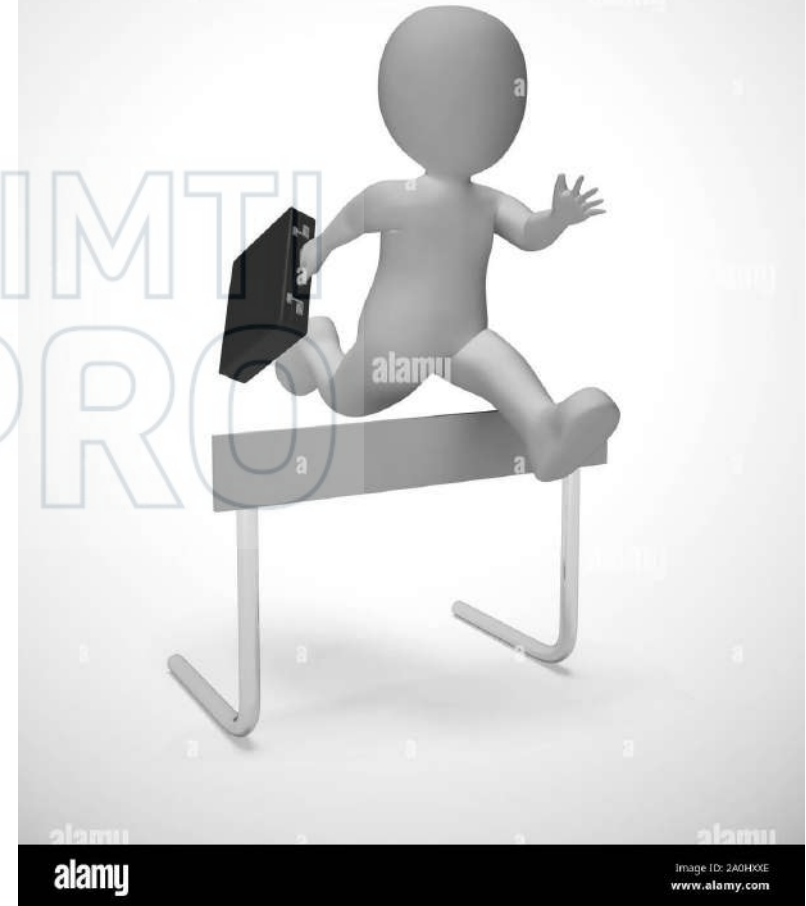
## PCR-SSO

- Difficile aggiornamento delle sonde
- Non è una vera alta risoluzione: ambiguità con alleli null
- Nuovi alleli non rilevabili

## PCR-SBT

- Molteplici passaggi per ottenere una tipizzazione col minor numero di ambiguità possibile;
- Impossibile tipizzare molti campioni in breve tempo, oltre all'impossibilità di sequenziare l'intero gene;
- Costi elevati.

## Next Generation Sequencing



# Piattaforme Next Generation Sequencing

**ion torrent**



**Single-Molecule Sequencing in Real Time (SMRT)**



**Sequencing by synthesis**

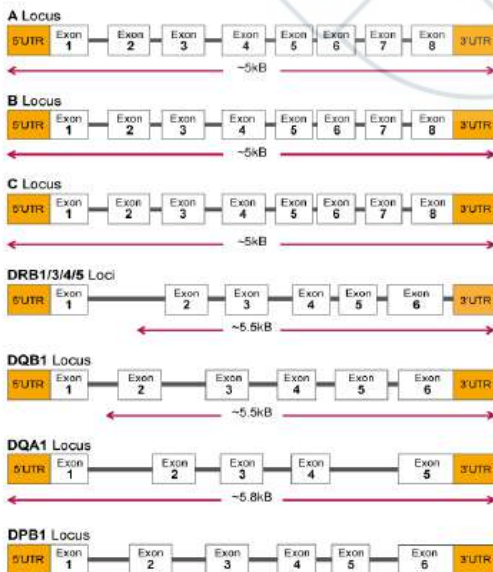
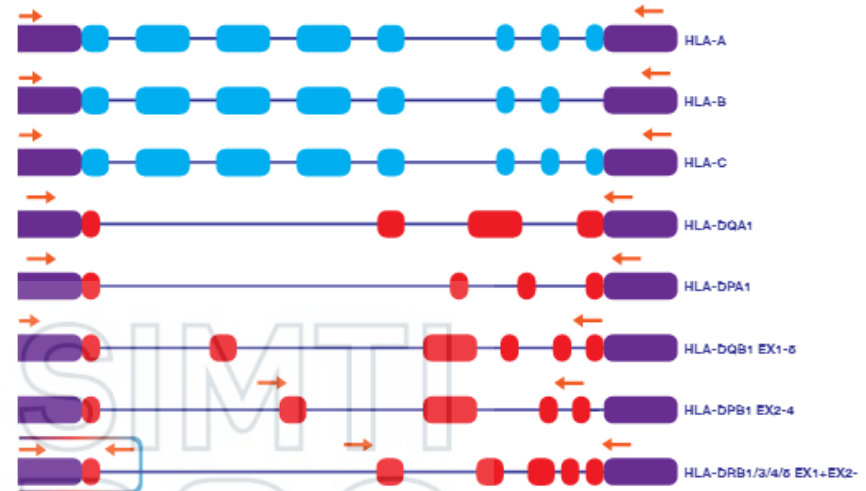
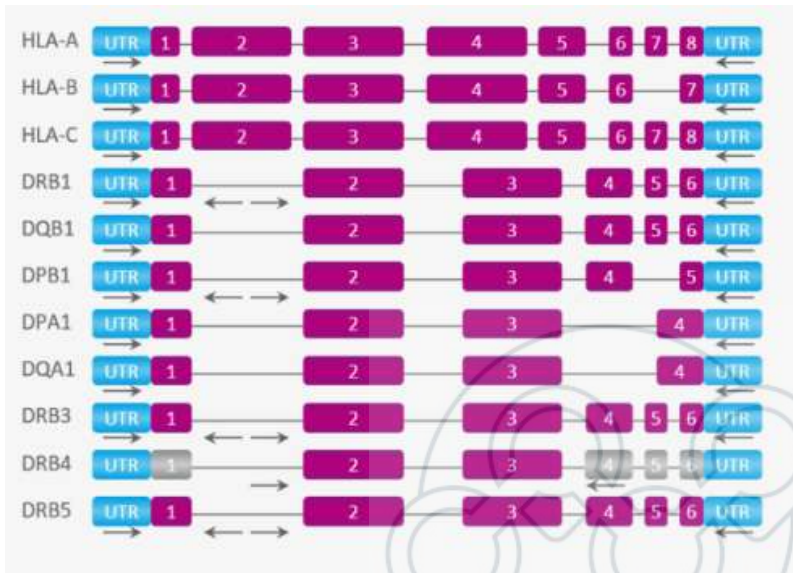


La più diffusa per la tipizzazione HLA con più fornitori in commercio che la utilizzano

**Nanopore**



# Copertura genica amplificazione

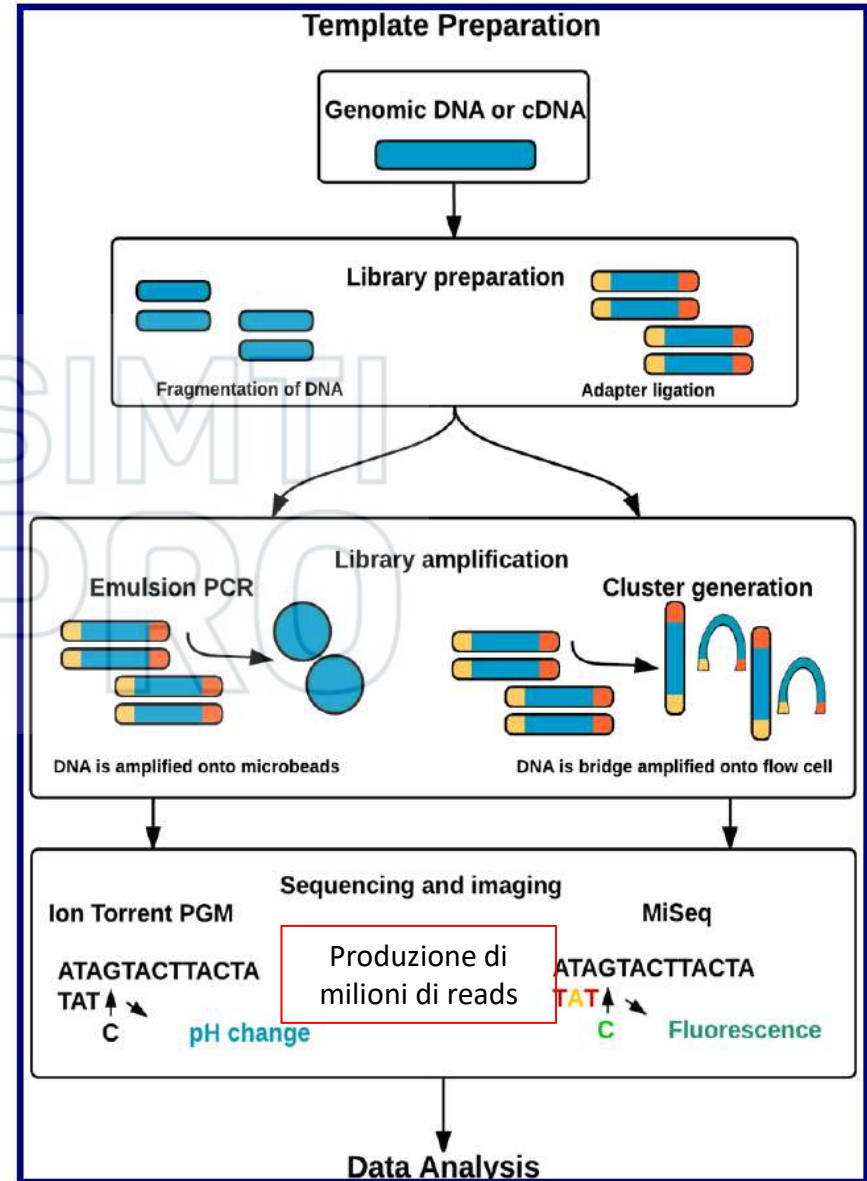
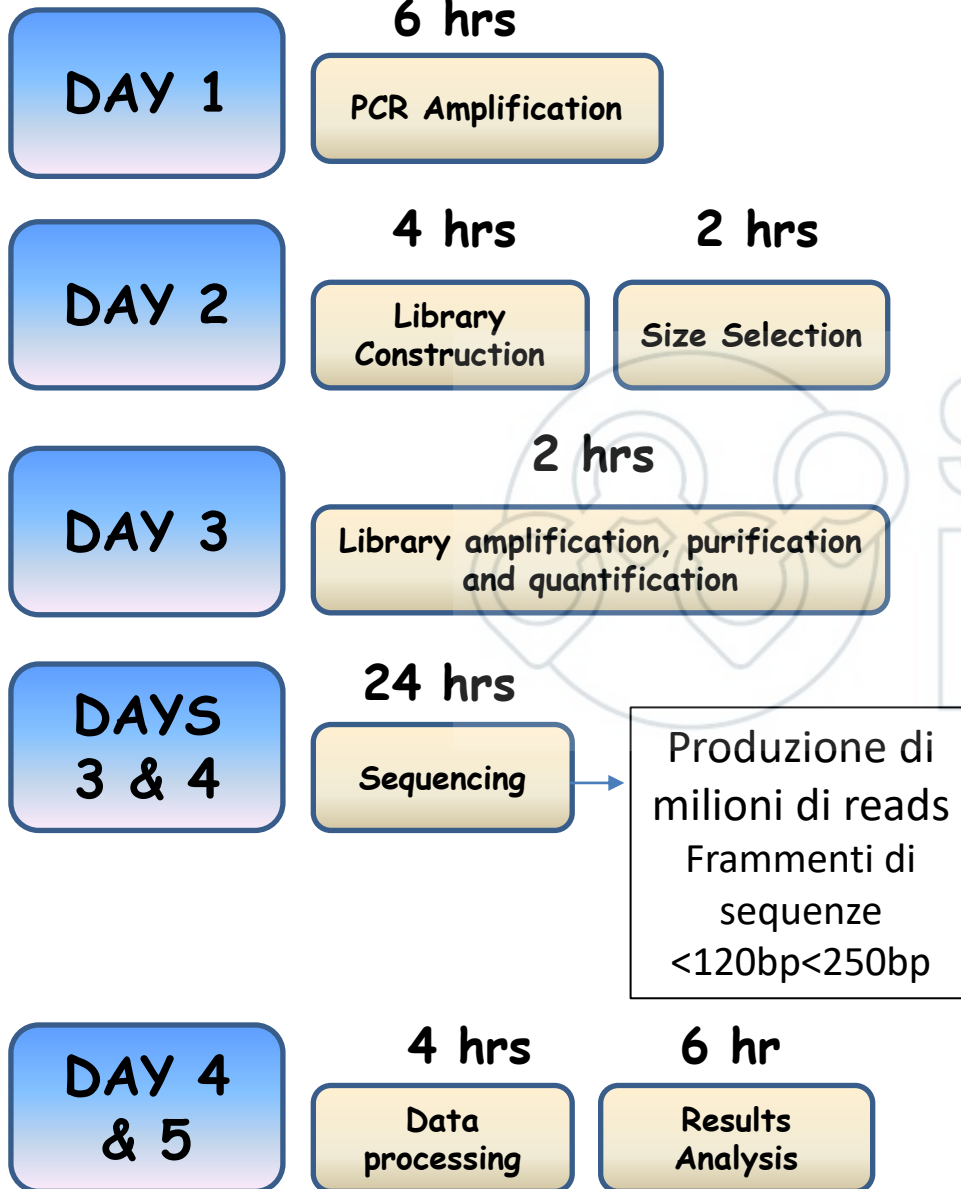


**Classe I**  
 Copertura genica completa  
 Tutti gli esoni + tutti gli introni

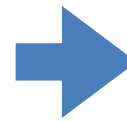
**Classe II**  
 Copertura genica parziale  
 Exoni ed introni più informativi



# Procedura



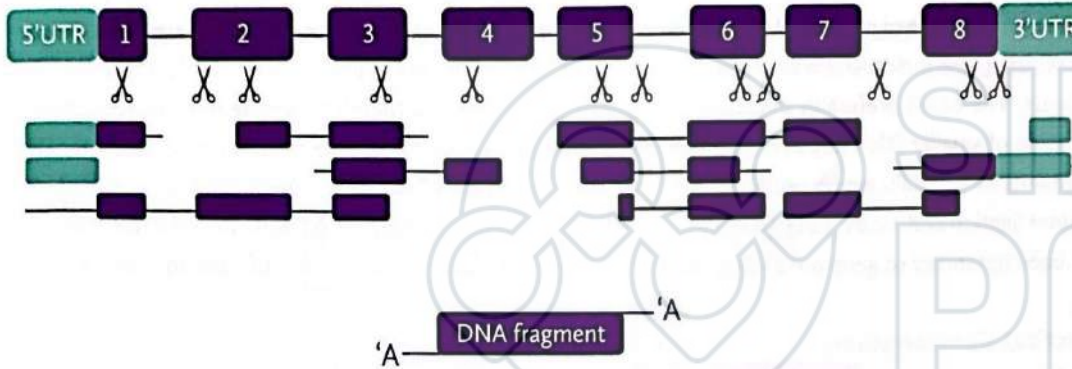
# Preparazione della Libreria



**Libreria** = DNA che contiene adattatori che permettono di legarsi alla piattaforma di sequenziamento ed indici o barcode per l'identificazione dei campioni.

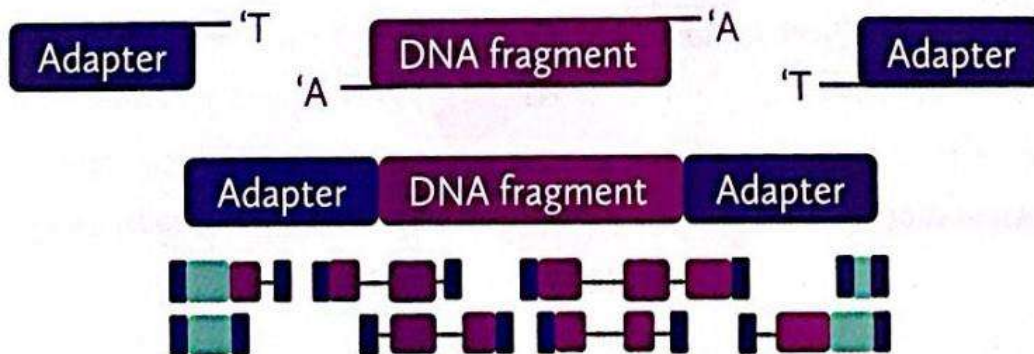
1. Fragmentation
2. Adapter Ligation
3. Size selection
4. Indexing

## 1. Fragmentation



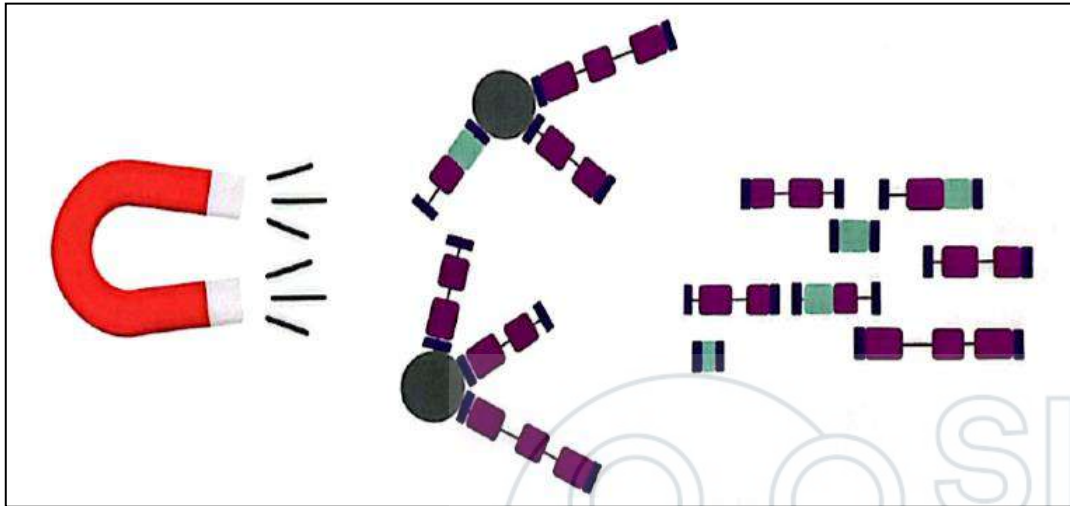
La reazione di frammentazione, tramite l'utilizzo di due enzimi, genera piccoli frammenti di DNA di dimensioni tra 100 e 1000bp. Riparazione con aggiunta di coda dA all'estremità dei frammenti per consentire il legame all'adattatore.

## 2. Adapter Ligation



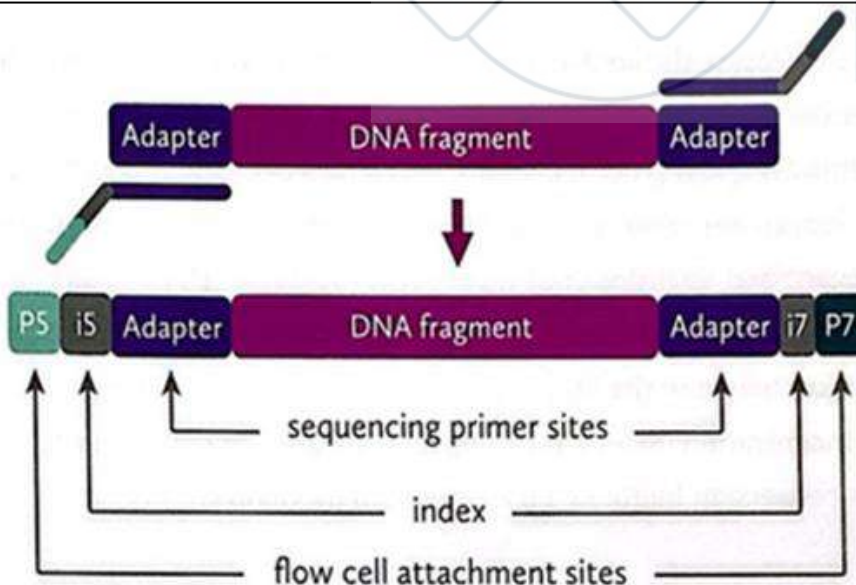
Gli adattatori hanno una T all'estremità che permette di legarsi alla A terminale dei frammenti. L'adattatore è universale uguale per tutti i campioni e serve in seguito per legare le molecole di DNA alla piattaforma di sequenziamento.

### 3. DNA cleanup e size selection



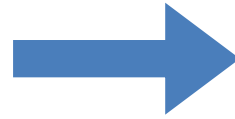
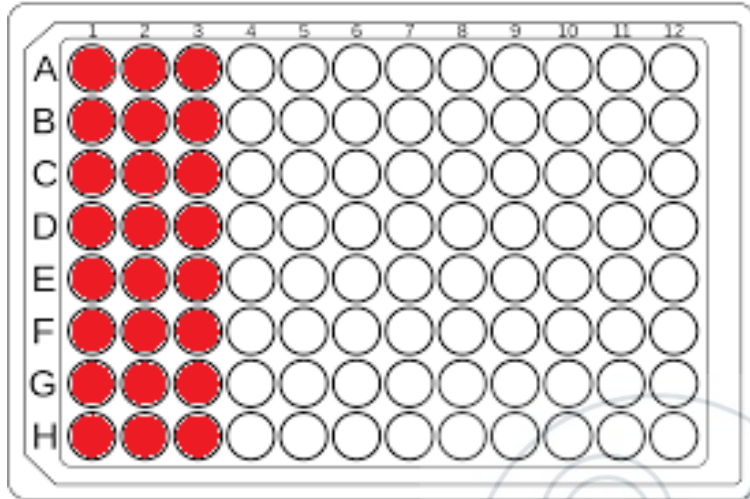
Utilizzo di biglie magnetiche specifiche per legare **frammenti di dimensioni tra 400 e 1000 bp** in modo da rimuovere i frammenti con dimensioni inferiori a 400bp. La selezione dei frammenti più lunghi migliora la reazione di sequenziamento e l'analisi dei risultati

### 3. Indexing

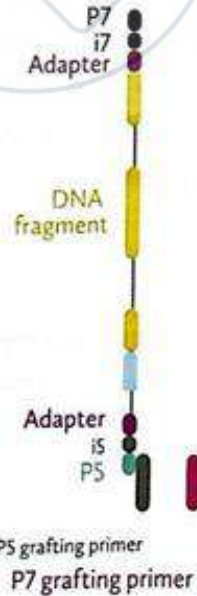


Ogni indice ha una piccola sequenza che si lega all'adattatore universale che era stato aggiunto precedentemente e una **sequenza barcode unica di 8 nucleotidi** (i5 o i7) specifica per ogni campione, seguita dalle sequenze di attacco alla flow-cell P5 o P7. Ogni frammento avrà ad una estremità i5 + p5 e all'altra i7 + P7.

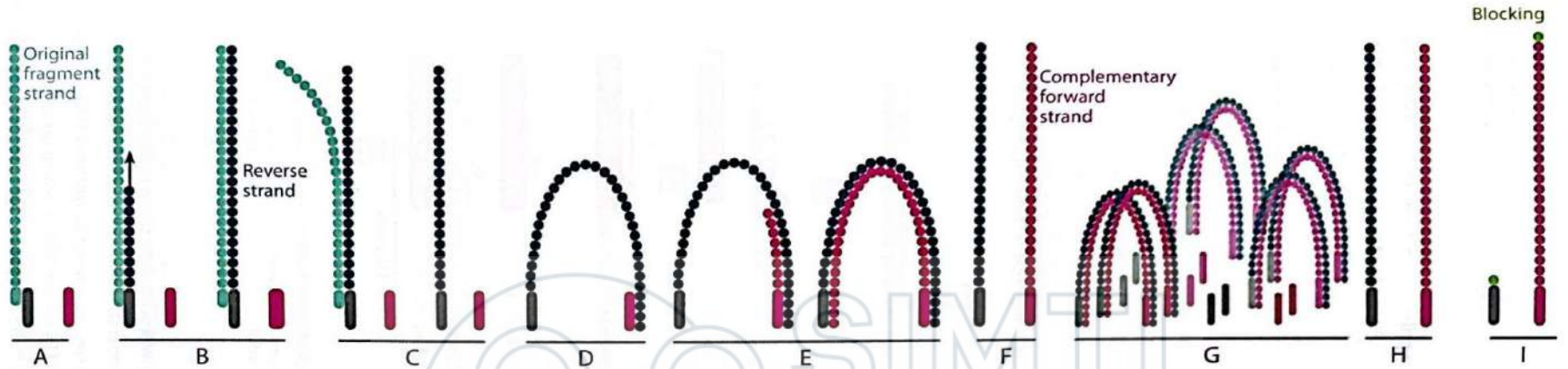
# Pooling Libreria



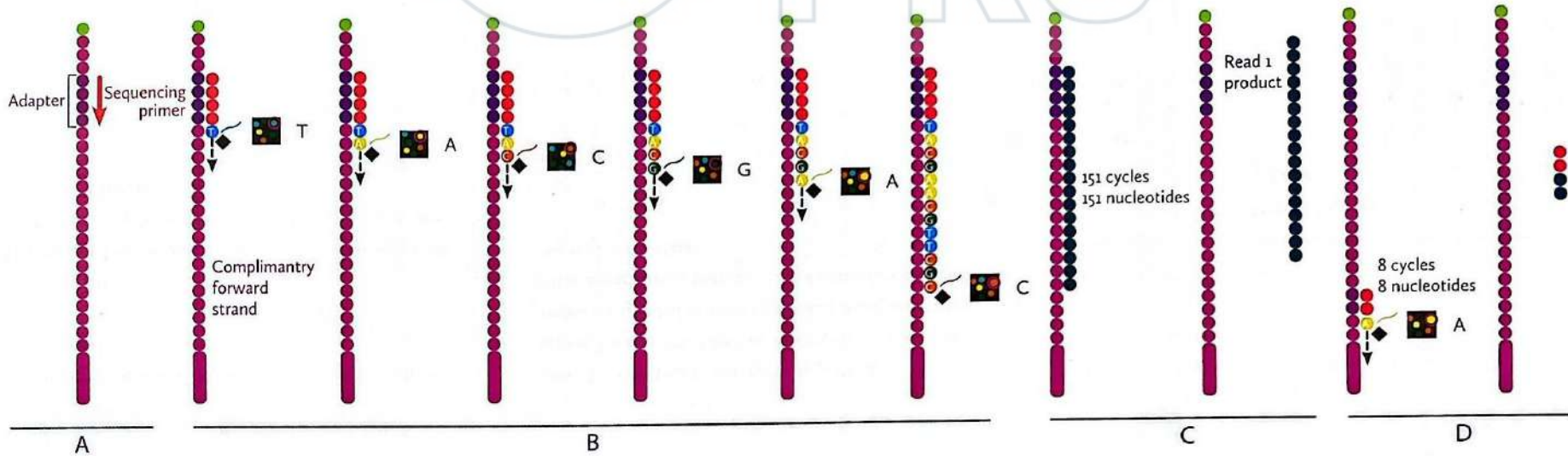
Caricamento sul sequenziatore



# Amplificazione Clonale



# Sequenziamento



# NGS Data Analysis

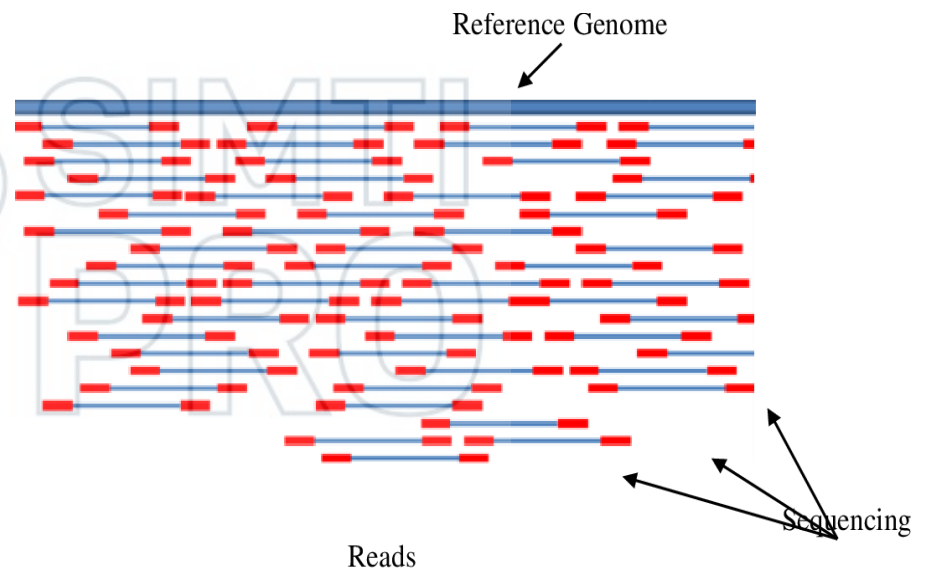
## Reads alignment

### Software di analisi

L'analisi dei frammenti ottenuti viene eseguita da software che utilizzano uno o più algoritmi informatici.

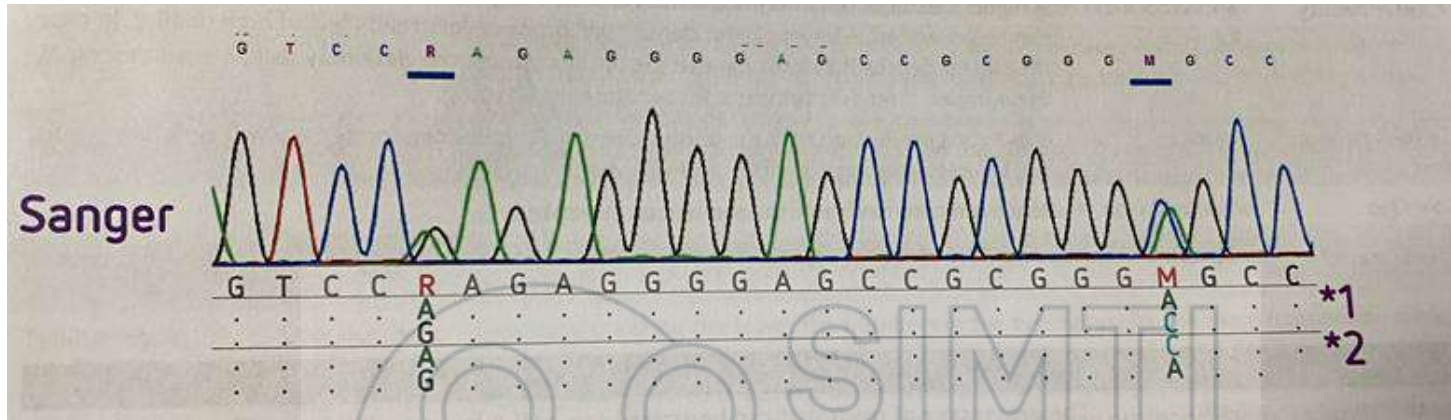
### Due tipologie di software:

1. Compongono una sequenza lineare (Contig) a partire dai diversi frammenti e la appaiano alla sequenza più simile trovata nel database IMG-T-HLA.
2. Allineano i diversi frammenti al database IMG-T-HLA fino a trovare l'allele a cui appartengono.

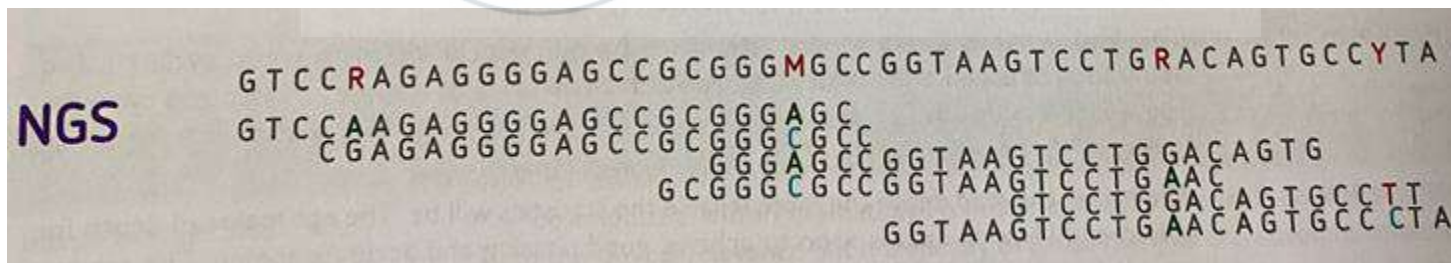


# NGS Data Analysis

## Haplotype Phasing



- I due alleli possono essere separati soltanto applicando i primer gruppo specifici (gSSPs).
- Sono necessari molteplici passaggi per ottenere un risultato senza ambiguità.



- Le reads vengono generate dall'allele 1 o dall'allele 2, pertanto con l'analisi è possibile ottenere direttamente le sequenze dei due alleli separatamente.
- Risultati senza ambiguità.

# NGS Data Analysis

## Parametri di qualità

Devono essere stabiliti dei valori soglia dei parametri di qualità per poter accettare o rifiutare i risultati di una tipizzazione NGS.

### Statistiche globali della seduta:

- valid reads > 80%
- Insert size: 250-400

### Statistiche per singolo campione:

- Read count: >10000
- Quality score: >Q30
- Read depth (Coverage) >30 in tutta la sequenza esonica
- Discordanza tra mapping e phasing
- Percentuale del secondo allele >20%

(Rapporto ottimale allele 1 vs allele 2: 50% vs 50%)

Exon mismatches (MME): 0

- In caso di un Perfect match, non ci saranno mismatch esonici. In caso di un mismatch esonico, questo indica la presenza di un nuovo allele che deve essere verificato tramite altro metodo di sequenziamento (PCR-SBT)

Intron mismatches (MMI): n.a.

- La presenza di mismatch intronici è meno importante dei mismatch esonici perché hanno minore rilevanza clinica. Per moltissimi alleli HLA, inoltre, non ci sono dati sulla sequenza degli introni nel database IMGT/HLA e pertanto i mismatch presenti in queste regioni potrebbero non essere veri mismatches.

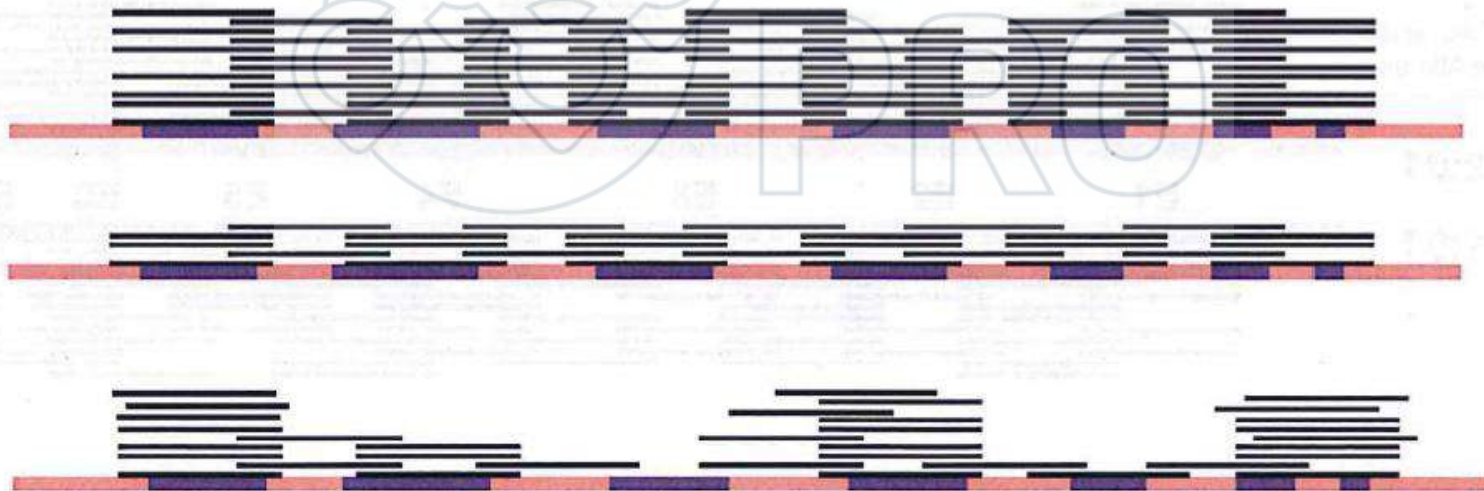


# NGS Data Analysis

## Parametri di qualità

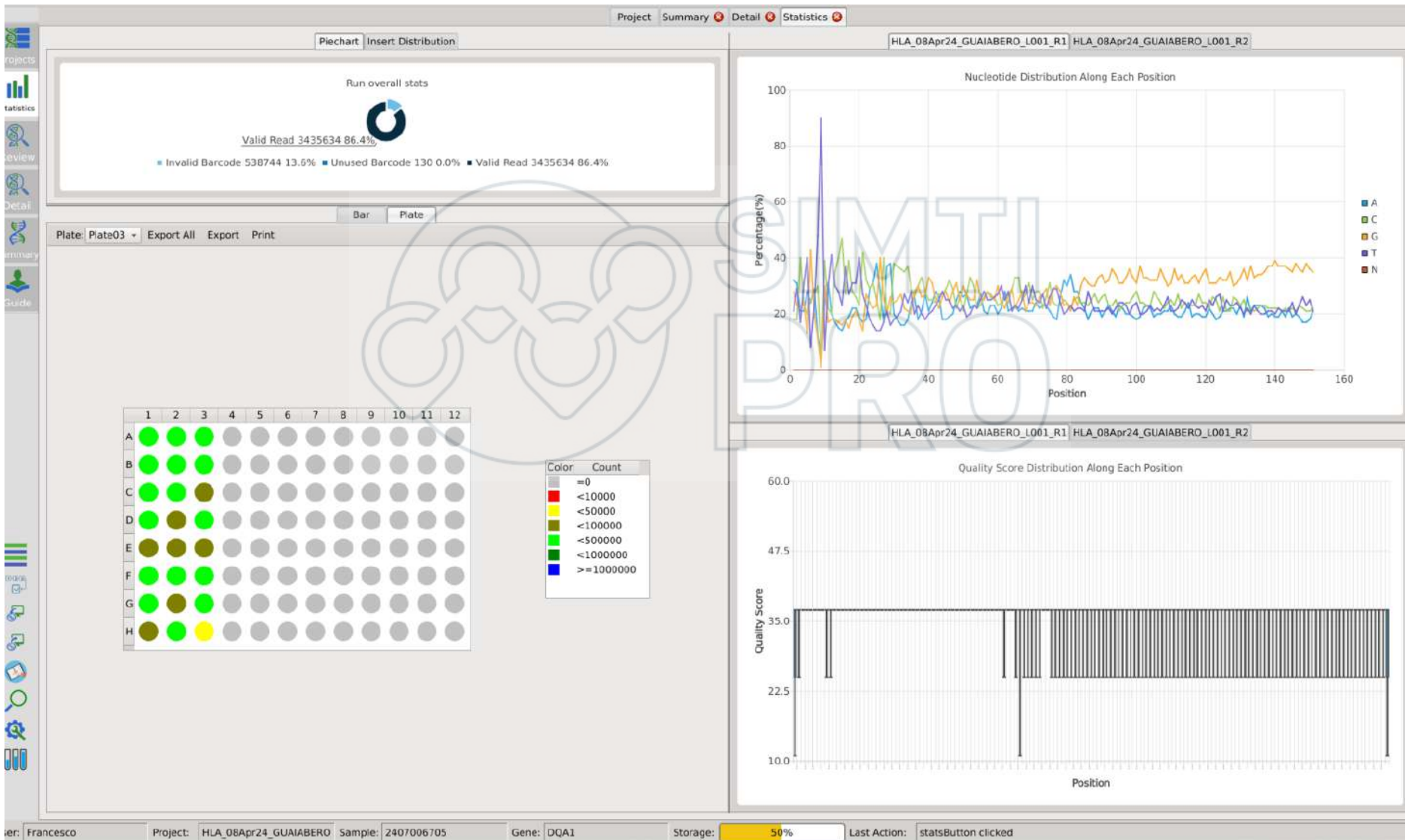
### Read Depth & Uniformity

Due to the massively parallel nature of NGS, multiple reads (different library fragments) will have overlapping sequence. **Read Depth** at a position is defined by the number of reads covering that position. Higher read depth = greater accuracy. **Read Uniformity**, describes how uniform the read depth is across the targeted region.



# NGS Data Analysis

## Statistiche globali della seduta



# NGS Data Analysis

## Statistiche per singolo campione

Project Statistics Summary Detail

Sample: Plate03\_A01 [PA02006: ▾]  
Locus: A  
Last visited: 22-04-2024T08:54:13  
Sample QC

UnApprove UnConfirm Report

Allele	Call Cmt	MME	MME234	MMI	cRead	Cov	Cen	eRead	Cov	Cen	gRead	Cov	Cen	xRead	Cov	Cen
A*03:01:01:03	✓	0	0	0	1656	45	10	516	45	10	1894	40	11	1728	40	12
A*24:02:01:01	✓	0	0	0	1616	43	13	432	43	13	2147	37	12	1991	37	12
A*03:01:01:01		0	0	1	1656	45	10	516	45	10	2200	-2	0	2036	-2	0
A*03:01:01:02N		0	0	2	1656	45	10	516	45	10	2058	-4	0	1895	-4	0
A*03:01:01:04		0	0	29	1656	45	10	516	45	10	1507	-34	0	1368	-34	0
A*03:01:01:05		0	0	2	1656	45	10	516	45	10	2040	-6	0	1876	-6	0
A*03:01:01:06		0	0	2	1656	45	10	516	45	10	1924	-2	0	1771	-2	0
A*03:01:01:07		0	0	3	1656	45	10	516	45	10	1481	-11	0	1331	-11	0
A*03:01:01:08		0	0	2	1656	45	10	516	45	10	2139	-9	0	1983	-9	0
A*03:01:01:09		0	0	2	1656	45	10	516	45	10	1503	-6	0	1355	-6	0

Read Coverage with Shadow

Reason: Ambiguities present  
Action: The following types are equally possible:  
HLA-A\*24:02:01:108+HLA-A\*03:01:01:03  
HLA-A\*24:02:01:78+HLA-A\*03:01:01:03  
HLA-A\*24:02:01:87+HLA-A\*03:01:01:03  
HLA-A\*24:02:01:96+HLA-A\*03:01:01:03

546 A:1 G:336

Coverage: 571, Length: 600

Contig1: GGCT - CCCACTCCATGAGGTATTTCTC - CACATC - CGTGTCCC - CGCCGCGC - GGG - AGCCCCG - CTTC - TCGCCGTGGCTA

Contig2: GGCT - CCCACTCCATGAGGTATTTCTT - CACATC - CGTGTCCC - CGCCGCGC - GGG - AGCCCCG - CTTC - TCGCCGTGGCTA

Annotation: GGCT - CCCACTCCATGAGGTATTTCTC - CACATC - CGTGTCCC - GCTA

GGCT - CCCACTCCATGAGGTATTTCTC - CACATC - CGTGTCCC - GCG - GCG - AGCCCCG - CTTC - TCGCCGTGGCTA

# NGS Data Analysis

## Statistiche per singolo campione

The screenshot displays a detailed view of NGS data analysis for a specific sample (Plate03\_A01). The interface is divided into several sections:

- Table:** A table listing various alleles and their associated metrics. The columns include Allele, Call Cmt, MME, MME234, MMI, cRead, Cov, Cen, eRead, Cov, Cen, gRead, Cov, Cen, xRead, and Cen. The first two alleles, A\*03:01:01:03 and A\*24:02:01:01, are marked with green checkmarks, indicating they are the primary candidates.
- Read Coverage with Shadow:** Two line graphs showing the percentage of reads across the gene region. The left graph shows a peak at position 488, and the right graph shows a peak at position 301. A blue arrow points to the peak at 488, which is labeled 'Coverage >30'.
- Variant Details:** A section titled 'Reason: Ambiguities present' lists several HLA-A\*24:02:01:108+HLA-A\*03:01:01:03 variants. A blue arrow points to the third variant, 'HLA-A\*24:02:01:87+HLA-A\*03:01:01:03', which is noted as having 'Ambiguity at the fourth field'.
- Genomic Browser:** A visualization of the gene structure with exons labeled E1 through E5. A blue arrow points to the third exon (E3), which corresponds to the variant being analyzed.

Additional annotations on the image include:

- Coverage >30:** A red text label with a blue arrow pointing to the peak in the read coverage graph.
- Bilanciamento allelico OK:** A red text label with a blue arrow pointing to the read coverage graph.
- Parametri di qualità OK Risultato accettabile:** A red text label with a blue arrow pointing to the read coverage graph.
- Risultato al terzo campo senza ambiguità:** A red text label with a blue arrow pointing to the variant list.
- Ambiguità al quarto campo:** A red text label with a blue arrow pointing to the variant list.

# NGS Data Analysis

## Statistiche per singolo campione

Project Statistics Summary Detail
Candidate Candidate Pair

Allele	Call Cmt	MNE	MME23	MMI	cRead	Cov	Cen	eRead	Cov	Cen	gRead	Cov	Cen	xRead	Cov	Cen
DQA1*05:05:01:01	✓	0	0	16	293	17	1	66	17	6	859	-60	0	843	-60	0
DQA1*02:01:01:01	✓	36	28	549	133	5	1	25	5	1	384	2	0	374	2	0
DQA1*05:05:01:02		0	0	20	293	17	1	66	17	6	892	-1	0	876	-1	0
DQA1*05:05:01:03		0	0	17	293	17	1	66	17	6	828	-114	0	812	-114	0
DQA1*05:05:01:04		0	0	16	293	17	1	66	17	6	682	-52	0	666	-52	0
DQA1*05:05:01:05		0	0	21	293	17	1	66	17	6	680	-63	0	664	-63	0
DQA1*05:05:01:06		0	0	17	293	17	1	66	17	6	651	-122	0	635	-122	0
DQA1*05:05:01:07		0	0	24	293	17	1	66	17	6	704	-22	0	688	-22	0
DQA1*05:05:01:08		0	0	21	293	17	1	66	17	6	678	-28	0	662	-28	0
DQA1*05:05:01:09		0	0	12	293	17	1	66	17	6	859	-56	0	843	-56	0

Sample: Plate03\_H01 [2407006: -

Locus: DQA1

Last visited: 16-04-2024T09:39:54

Sample QC

UnApprove UnConfirm Report

PC Allele 1 Allele 2

A\*02:01:01:01 A\*01:01:01:01

B\*57:03:01:02 B\*37:01:01:01

C\*06:02:01:01

DRB1\*07:01:01:04 DRB1\*11:01:01:04

DRB4\*01:03:01:02N DRB3\*02:02:01:01

DOA1\*02:01:01:01 DOA1\*05:05:01:01

DQB1\*03:03:02:01 DQB1\*03:01:01:01

DPAL\*01:03:01:04 DPAL\*01:03:01:01

DPB1\*03:01:01:01 DPB1\*04:01:01:01

Coverage Shadow Central cDNA Browser Genomic Browser Reference Alignment Consensus Alignment

Read Coverage with Shadow

Reason: Number of contig different from genotype count

Action: Check candidate table and coverage plot

Reason: Ambiguities present

Action: The following types are equally possible:

HLA-DQA1\*05:05:01:01+HLA-DQA1\*02:01:01:03

Coverage

Length

Poly site

Phasing

Contig1

Contig2

Annotation

**Coverage <30**

**Sbilanciamento dei due alleli**

TGAAAGTCAGTTTCTTTTCATCA

AGTCAGTTTCTTTTCATCATTTGTGTATTAAGGTTCTTTCTCCCGTGTCTCCACCTTCTGCTTGTATCTTCACTCATCAGCTGACCACGTC

AGTCAGTTTCTTTTCATCATTTGTGTATTAAGGTTCTTTCTCCCGTGTCTCCACCTTCTGCTTGTATCTTCACTCATCAGCTGACCACGTC

CGTTTCTTGCCTTCTGCTTGTATCTTCACTCATCAGCTGACCACGTC

5386 C.43

CTCATCAGCTGACCACGTC

CTGTTCTTGCCTTCTGCTTGTATCTTCACTCATCAGCTGACCACGTC

**Risultato non accettabile**

**Da ripetere**

User: Francesco
Project: HLA\_08Apr24\_GUAIABERO
Sample: 2407006705
Gene: DQA1
Storage: 50%
Last Action: detailsButton clicked

# Tipizzazione HLA con tecnologia Next Generation Sequencing



## Pregi:

- ✓ Elevatissima Risoluzione (Allelica)
- ✓ Risultati HR senza ambiguità
- ✓ Numero elevato di campioni
- ✓ Costi contenuti (Se applicata a numero elevato di campioni)

## Difetti:

- ✓ Tempi di esecuzione (4 giorni)
- ✓ Procedura complessa
- ✓ Applicabile soltanto su grandi numeri

# Tipizzazione HLA con tecnologia NGS nel Lab HLA Palermo

## Tipologie di Studi HLA

## Strategia Precedente

## Strategia attuale

➤ Tx Cuore, Polmone

➤ HLA e malattia

➤ Tx Reni

➤ 1° Inserimento IBMDR

➤ Studi Familiari Tx CSE

➤ Aploidentici Tx CSE

➤ Attivazioni MUD CSE

➤ Donatori MUD TC CSE

11 loci HR  
non necessari

**PCR-SSO**  
**Luminex**  
Risoluzione  
Intermedia/Alta

**11 Loci HR**  
**>2000 Test**  
**annui**

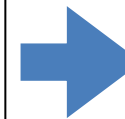
**PCR-SBT**  
**Sanger**  
Risoluzione Alta

**PCR-SBT**  
**Sanger**  
Risoluzione Alta

**PCR-SSO**  
**Luminex**  
Risoluzione  
Intermedia/Alta

**NGS**  
Risoluzione  
Alta/Allelica

Fallimenti o  
nuovi alleli



# Tipizzazione HLA con tecnologia NGS

## Esperienza del Lab HLA Palermo

- Inizio 2019;
- Metodo validato tipizzando n100 campioni noti;
- Inizialmente applicata soltanto a donatori IBMDR al primo inserimento;
- Dal 2021 applicata anche a tutti gli studi per Tx CSE (Familiari, Attivazioni MUD, MUD TC, Aploidentici), Inserimenti in lista per Tx Rene.



La tecnologia Next Generation Sequencing ci ha permesso di superare i limiti dei metodi tradizionali, ottenendo quasi sempre risultati univoci ad alta risoluzione con il vantaggio di poter tipizzare molti campioni in un'unica corsa, massimizzando l'efficienza e riducendo il costo per campione.



# Tipizzazione HLA con tecnologia NGS

## Esperienza del Lab HLA Palermo

Nuovi alleli



NIH National Library of Medicine  
National Center for Biotechnology Information

PubMed®

Search: cappuzzo ingrassia

Advanced Create alert Create RSS User Guide

Save Email Send to Sort by: Most recent Display options

RESULTS BY YEAR

12 results

Page 1 of 2

Year	Number of Results
2013	1
2020	4
2024	1

MY NCBI FILTERS

TEXT AVAILABILITY

- Abstract
- Free full text
- Full text

ARTICLE ATTRIBUTE

- Associated data

1 Characterization of the novel HLA-B\*35:08:17 allele.  
Ingrassia F, Pecoraro A, Blando M, Corica AA, Cappuzzo V.  
HLA. 2024 Feb;103(2):e15365. doi: 10.1111/tan.15365.  
PMID: 38304991

2 Identification of the novel HLA-B\*51:367 allele in a cord blood donor by next-generation sequencing.  
Ingrassia F, Pecoraro A, Blando M, Corica AA, Cappuzzo V.  
HLA. 2022 Oct;100(4):372-374. doi: 10.1111/tan.14698. Epub 2022 Jun 14.  
PMID: 35652705 Review.

# Tipizzazione HLA con tecnologia NGS

## Esperienza del Lab HLA Palermo

**Nuovi alleli**



NIH National Library of Medicine  
National Center for Biotechnology Information

PubMed®

Search: cappuzzo ingrassia

Advanced Create alert Create RSS User Guide

Save Email Send to Sort by: Most recent Display options

RESULTS BY YEAR

12 results

Page 1 of 2

Year	Number of Results
2013	1
2014	1
2015	1
2016	1
2017	1
2018	1
2019	1
2020	4
2021	2
2022	2
2023	0
2024	1

MY NCBI FILTERS

- Abstract
- Free full text
- Full text
- Associated data

1 Characterization of the novel HLA-B\*35:08:17 allele.  
Ingrassia F, Pecoraro A, Blando M, Corica AA, Cappuzzo V.  
HLA. 2024 Feb;103(2):e15365. doi: 10.1111/tan.15365.  
PMID: 38304991

2 Identification of the novel HLA-B\*51:367 allele in a cord blood donor by next-generation sequencing.  
Ingrassia F, Pecoraro A, Blando M, Corica AA, Cappuzzo V.  
HLA. 2022 Oct;100(4):372-374. doi: 10.1111/tan.14698. Epub 2022 Jun 14.  
PMID: 35652705 Review.

➤ **N4 nuovi alleli dal 1990 al 2019**

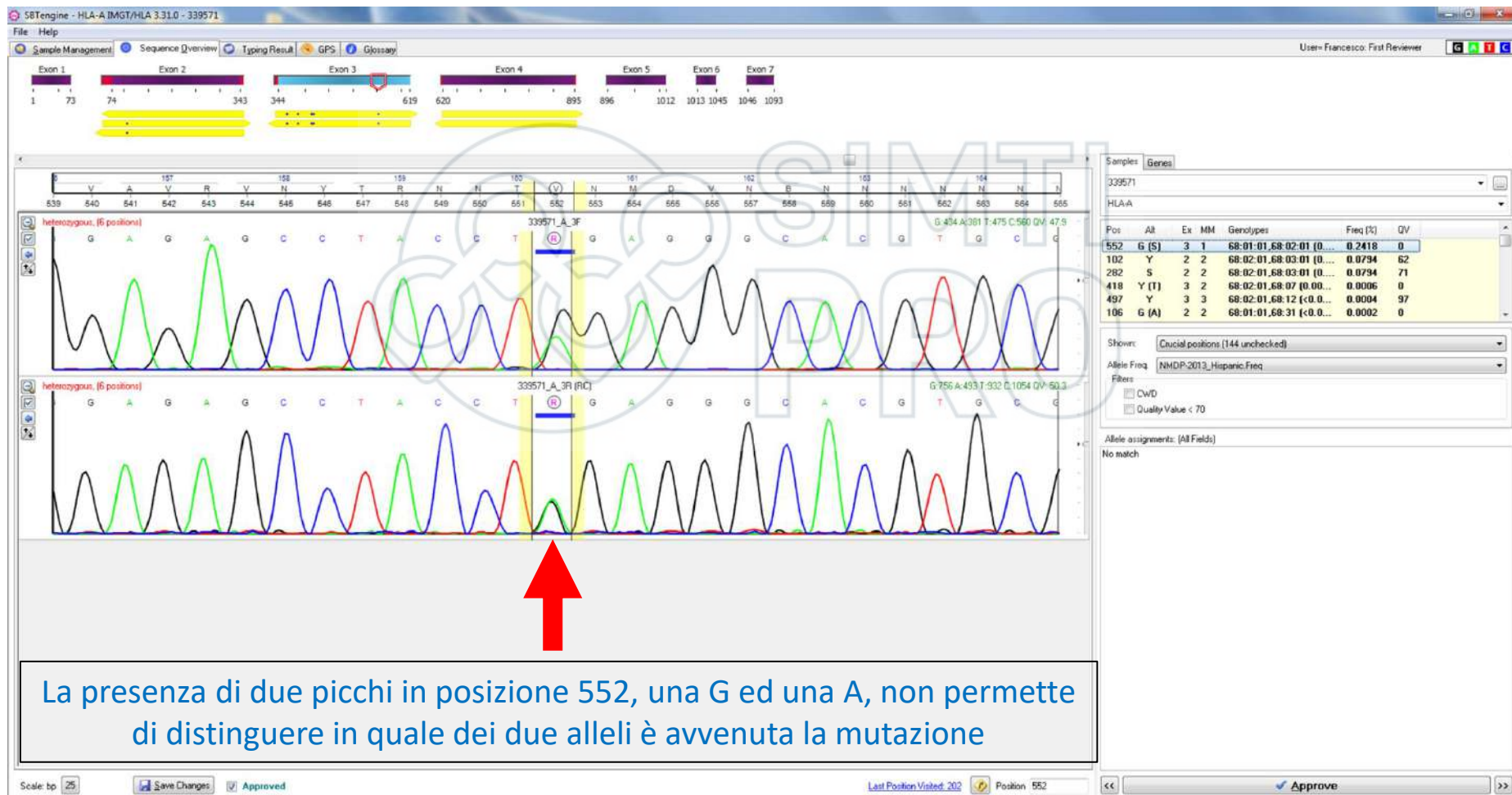
**vs**

➤ **N 8 nuovi alleli dal 2020 al 2024**

## The novel *HLA-A\*68* variant, *HLA-A\*68:02:16*, identified by next-generation sequencing

Francesco Ingrassia | Alice Pecoraro | Maria Blando | Floriana Bruno |  
Valentina Cappuzzo

Con il metodo Sanger non è stato possibile distinguere quale dei due alleli presentasse la mutazione perché era omozigote A\*68 e non erano disponibili primer per ottenere le sequenze dei due alleli isolati



La presenza di due picchi in posizione 552, una G ed una A, non permette di distinguere in quale dei due alleli è avvenuta la mutazione

## The novel *HLA-A\*68* variant, *HLA-A\*68:02:16*, identified by next-generation sequencing

Francesco Ingrassia | Alice Pecoraro | Maria Blando | Floriana Bruno |  
Valentina Cappuzzo

La tecnologia NGS ci ha permesso di ottenere due sequenze separate e abbiamo trovato un allele A\*68:01 e un secondo allele largamente omologo ad A\*68:02 con una sostituzione in posizione 552, una A invece di una G.

The screenshot displays the GENDX software interface for HLA-A analysis. The main window shows a sequence alignment of the HLA-A gene. A red circle highlights a G to A substitution at position 552. A pop-up window shows the variant call details:

Variant	Count
A	339
G	329
C	1
T	0
-	0

923 total reads, HI: 97%

The interface also shows the HLA-A gene structure, alignment statistics, and a list of variants. The variant call is A\*68:01:01:02 vs A\*68:02:01:01. The HLA-A gene structure is shown at the top, with exons and introns. The alignment shows the reference sequence and the variant sequence. The variant call is shown in a pop-up window. The interface also shows the HLA-A gene structure, alignment statistics, and a list of variants.

# Applicazione della Tecnologia NGS in campo Trasfusionale

Transfusion Medicine  
and Hemotherapy

Research Article

Transfus Med Hemother 2022;49:88–96  
DOI: 10.1159/000517565

Received: January 28, 2021  
Accepted: May 31, 2021  
Published online: August 11, 2021

## Application of Blood Group Genotyping by Next-Generation Sequencing in Various Immuno-haematology Cases

Tae Yeul Kim<sup>a</sup> HongBi Yu<sup>b</sup> Minh-Trang Thi Phan<sup>c</sup> Ja-Hyun Jang<sup>a</sup>  
Duck Cho<sup>a, b, c, d</sup>

<sup>a</sup>Department of Laboratory Medicine and Genetics, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, South Korea; <sup>b</sup>Department of Health Sciences and Technology, Samsung Advanced Institute for Health Sciences and Technology, Sungkyunkwan University, Seoul, South Korea; <sup>c</sup>Stem Cell and Regenerative Medicine Institute, Samsung Medical Center, Seoul, South Korea; <sup>d</sup>Department of Biopharmaceutical Convergence, Sungkyunkwan University, Suwon, South Korea

Negli ultimi anni, molti gruppi hanno progettato test di genotipizzazione dei gruppi sanguigni basati su NGS e hanno affrontato i problemi tecnici incontrati durante la convalida di questi test. Tuttavia, ci sono pochi studi che utilizzano la genotipizzazione dei gruppi sanguigni basata su NGS in contesti clinici reali.

**In questo studio, hanno applicato la genotipizzazione dei gruppi sanguigni basata su NGS in vari casi di immunoematologia riscontrati nella pratica clinica di routine.**

# Limiti dei metodi tradizionali di genotipizzazione gruppi sanguigni

## SNV-based molecular methods

I metodi molecolari basati su SNV consentono di testare solo un numero limitato di SNV; pertanto, un'analisi completa di tutti i geni dei gruppi sanguigni non è fattibile.

I test basati su SNV in genere prendono di mira solo una manciata di alleli null.

## Next Generation Sequencing



**I test basati su NGS hanno il potenziale per identificare tutti gli alleli null, consentendo una previsione accurata di fenotipi di gruppi sanguigni rari**

# Tipizzazione gruppi sanguigni con tecnologia Next Generation Sequencing



1. *ABO* subgroup alleles
2. Blood group chimerism
3. Rare blood group phenotypes in patients with antibodies to HFAs
4. Anti-CD47 interference in pretransfusion compatibility testing.

# Caso 1

## ABO subgroup alleles

Paziente maschio di 59 anni (paziente 1) con nessuna storia di tumori maligni.

### Test di agglutinazione

- No agglutinazione anti-A, anti-B e anti-A,B; Agglutinazione 2+ con cellule A1
- Fenotipo Ael

### Sequenziamento Sanger

- Sequenziando gli esoni 6 e 7 ABO, sono state identificate due varianti eterozigoti (NM\_020469.3:c.261delG e c.467C>T) Genotipo ABO\*A1.02/O.01.01

### NGS

- Ha permesso di sequenziare tutti gli esoni e le regioni introniche fiancheggianti del gene ABO e di scoprire una nuova variante eterozigote nell'introne ABO 1 (c.29-10T>G) non segnalata in precedenza in letteratura.

Il presente studio ha dimostrato che NGS è utile per identificare gli alleli del sottogruppo ABO.



# Caso 2

## *ABO chimerism*

Blood samples from 10-month-old dizygotic twins (patients 2 and 3) and their parents

### Test di agglutinazione

- Agglutinazione a campo misto con reagenti anti-A e anti-B;
- Due distinte popolazioni di globuli rossi: globuli rossi del gruppo B (popolazione principale) e globuli rossi del gruppo A (popolazione minore).

### Sequenziamento Sanger

- Non è riusciti a rilevare alcun picco corrispondente a c.297A e c.467C>T (presente su ABO\*A1.02 ma assente su ABO\*B.01 e ABO\*O. 01.02).

### NGS

- Il test NGS ha rilevato accuratamente l'allele minore ABO\*A1.02 coesistente con il genotipo maggiore ABO\*B.01/O.01.02 nei gemelli dizigoti (pazienti 2 e 3). Considerando i VAF di c.297A e c.467C>T esclusivi di ABO\*A1.02, la percentuale di ABO\*A1.02 è stata stimata pari al 3–6%, che è inferiore al limite di rilevamento del sequenziamento di Sanger (15– 20%).

**Questo studio ha dimostrato l'utilità dell'approccio NGS nel rilevare bassi livelli di chimerismo dei gruppi sanguigni.**

# Caso 3

## *Rare blood group phenotypes in patients with antibodies to HFAs*

Donna incinta alla 29a settimana di gestazione (paziente 4) taglio cesareo d'urgenza.

I tipi ABO e RhD della paziente erano del gruppo A, D-positivi e il suo plasma ha reagito con tutti i globuli rossi reagenti nella provetta IAT (1+) e nel gel IAT (2+). Il suo plasma ha reagito anche con tutti i globuli rossi reagenti trattati con papaina (3+). Il DAT era negativo per IgG e C3d.

**Anticorpi anti-HFA+**



Un'opzione per determinare la specificità dell'anticorpo in un paziente con un anticorpo contro un HFA è prevedere il fenotipo raro del paziente (fenotipo HFA negativo o fenotipo nullo) utilizzando metodi molecolari.

### **NGS**

L'analisi NGS ha identificato una variante omozigote NULL nell'esone 4 ABCG2 (NM\_004827.3:c.376C>T, p.Gln126\*; rs72552713).

il genotipo del paziente è stato determinato come ABCG2\*01N.01/01N.01.

Senza NGS, sarebbe stato necessario testare numerosi fenotipi sanguigni rari come Jr(a-), K0 e Lan- utilizzando il metodo sierologico, il che sarebbe stato costoso e avrebbe richiesto molto tempo.

# Caso 4

## Anti-CD47 interference in pretransfusion compatibility testing.

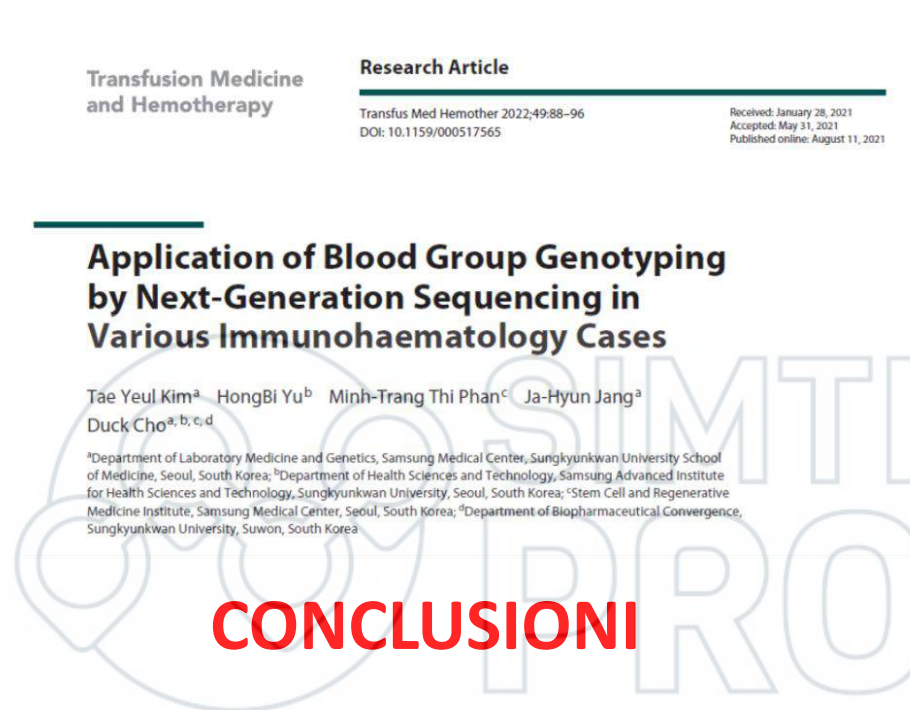
2 pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B (pazienti 5 e 6) avrebbero dovuto iniziare ALX148, un nuovo farmaco anti-CD47.

I farmaci anti-CD47 come ALX148 e Hu5F9-G4 interferiscono con i test di compatibilità pretrasfusionale, complicando così la fornitura sicura e tempestiva di unità di globuli rossi

I metodi tradizionali di studio della compatibilità del fenotipo o del genotipo potrebbero non rilevare anticorpi clinicamente significativi. Teoricamente, NGS può identificare tutti gli alleli dei gruppi sanguigni, consentendo il massimo livello di corrispondenza e riducendo così al minimo il rischio di perdere anticorpi clinicamente significativi

In questo studio, il test NGS ha previsto correttamente tutti i fenotipi dei gruppi sanguigni nei sistemi MNS, Rh, Kell, Duffy e Kidd, dimostrando l'utilità della genotipizzazione dei gruppi sanguigni basata su NGS nel mitigare l'interferenza anti-CD47 nei test di compatibilità pretrasfusionale

# Tipizzazione gruppi sanguigni con tecnologia Next Generation Sequencing



- NGS è uno strumento efficace per identificare gli alleli dei sottogruppi ABO, bassi livelli di chimerismo dei gruppi sanguigni e anticorpi contro gli HFA.
- La genotipizzazione dei gruppi sanguigni basata su NGS può essere utilizzata per risolvere l'interferenza anti-CD47 nei test di compatibilità pretrasfusionale.
- La genotipizzazione dei gruppi sanguigni basata su NGS può essere applicata a vari casi di immunoematologia riscontrati nella pratica clinica di routine.



Laboratorio Regionale di Tipizzazione Tissutale  
U.O.S. HLA



Rosalba Bavetta



Tiziana Traina

Francesco Ingrassia



Alice Pecoraro



Alessia Corica



Floriana Bruno



Maria Blando



Serena Mistretta



Giuseppe Davì



Floriana Di Paola



U.O.C. Medicina Trasfusionale e dei Trapianti  
Direttore Roberta Fedele

GRAZIE PER  
L'ATTENZIONE

