

45°

Convegno Nazionale
di Studi di Medicina Trasfusionale

Rimini | 29-31 maggio 2024



DISCREPANZE ABO

Donatella Londero

Dipartimento Medicina Trasfusionale

Azienda Sanitaria Universitaria Friuli Centrale - Udine



ASU FC
Azienda sanitaria
universitaria
Friuli Centrale



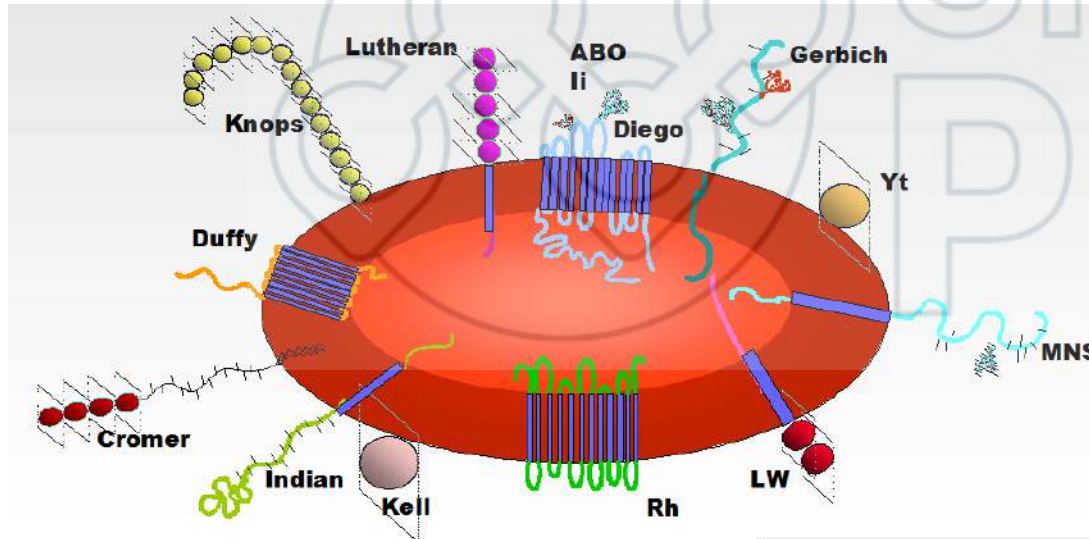
REGIONE AUTONOMA
FRIULI VENEZIA GIULIA

La sottoscritta, Donatella Londero, 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.

Indagini Pre-trasfusionali

Scopo delle Indagini diagnostiche pre-trasfusionali è l'accertamento della **compatibilità immunologica tra il donatore ed il ricevente**, garantendo la sopravvivenza delle emazie trasfuse (efficacia trasfusionale) ed evitando reazioni avverse (rischi per il ricevente)



RICEVENTI	DONATORI							
	0 Rh-	0 Rh+	A Rh-	A Rh+	B Rh-	B Rh+	AB Rh-	AB Rh+
0 Rh-	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
0 Rh+	✓	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗
A Rh-	✓	✗	✓	✗	✗	✗	✗	✗
A Rh+	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✗	✗
B Rh-	✓	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✗
B Rh+	✓	✓	✗	✗	✓	✓	✗	✗
AB Rh-	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
AB Rh+	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

DM 2 novembre 2015

Disposizioni relative ai requisiti di qualità e sicurezza del sangue e degli emocomponenti (Allegato VII)

Indagini Pre-trasfusionali

Per l'assegnazione di emocomponenti eritrocitari deve essere garantita l'esecuzione delle seguenti indagini pre-trasfusionali:

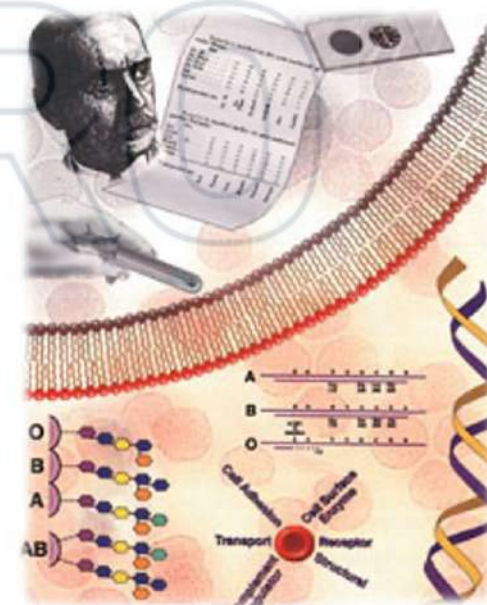
- ✓ **prima determinazione del gruppo ABO (prova diretta e indiretta) e del tipo Rh (D) del ricevente**, eseguita anche in tempi antecedenti la richiesta, nel rispetto dei criteri di sicurezza relativi alla identificazione del paziente
- ✓ **controllo del gruppo ABO (prova diretta) e del tipo Rh(D)** del ricevente su campione di sangue prelevato in momento diverso rispetto al campione utilizzato per la prima determinazione del gruppo sanguigno. Il controllo del gruppo ABO (prova diretta) e del tipo Rh(D) del ricevente deve essere ripetuto ad ogni richiesta trasfusionale, sul campione ematico che accompagna la richiesta stessa
- ✓ **ricerca di alloanticorpi irregolari anti-eritrocitari**, volta ad escludere la presenza di anticorpi irregolari di rilevanza trasfusionale

Sistema ABO

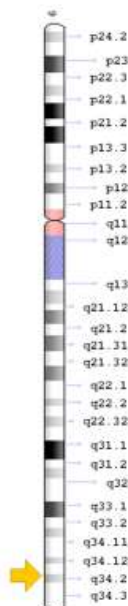
- **Landsteiner (1900):** osserva il fenomeno della agglutinazione (agglutinogeni e isoagglutinine) e scopre gruppi A, B, O
- **von Decastello e Sturli (1902):** gruppo AB
- **Yamamoto (1990):** clona e sequenzia cDNA che codifica la tran sferasi A;
- **Ugozzoli e Wallace (1992):** applicano la PCR (ASP) alla determinazione del gruppo ABO;
- **Yip (2002):** riporta l'esistenza di più di 70 alleli ABO;
- **Gueuning (2023):** 154 sequenze aplotipiche.

ABO:

il più importante Sistema Gruppo-ematico

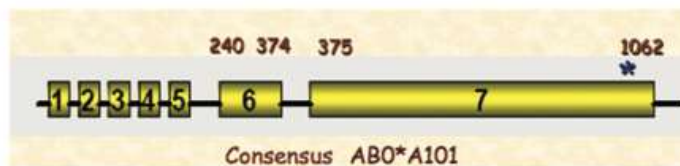


Genetica del Sistema ABO



Gene *ABO*:

- cromosoma 9 (9q34.1-q34.2)
- 7 esoni e 6 introni
- Sequenza di riferimento: ***ABO**A1.01**



Prodotti genici:

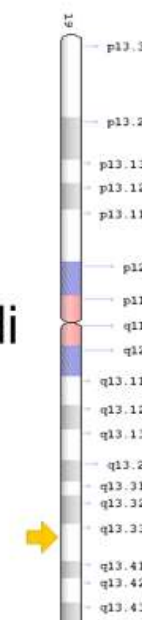
- A Transferasi (N-AcetylGalactosamine)
- B Transferasi (D-Galactose)
- O (prodotto non funzionale)

Geni del Sistema H (*FUT1* e *FUT2*):

- cromosoma 19 (19q13.33)
- Alleli ***FUT1**01** (H+); ***FUT1**01N.01** (h) nei tessuti eritroidi
- Alleli ***FUT2**01** (Se); ***FUT2**01N.01** (se) nelle secrezioni

Prodotti genici:

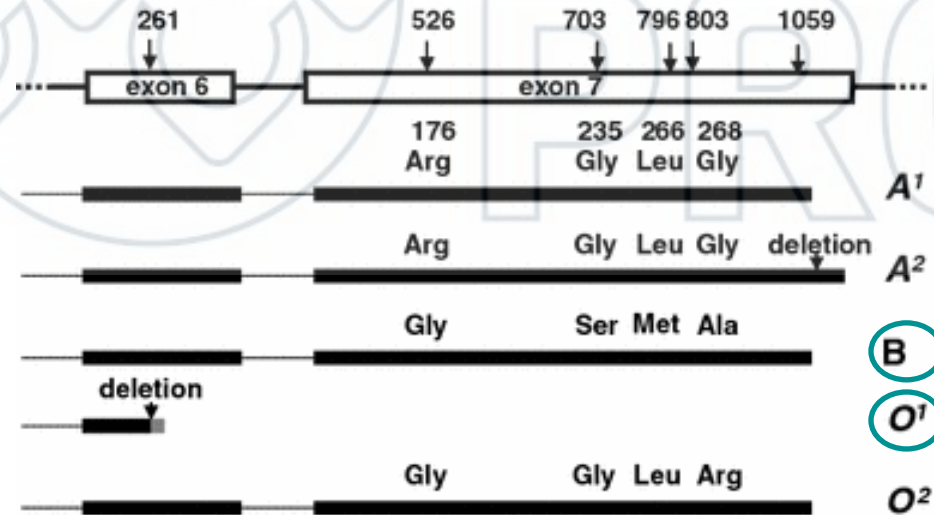
- α 1,2-fucosiltrasferasi



Genetica del Sistema ABO

Singole delezioni o sostituzioni nucleotidiche a livello degli esoni 6/7 determinano le differenze tra i 3 principali alleli:

- ***O.01.01** differisce da ***A1.01** per la delezione di una singola base (G) nel nucleotide 261: si ha frame-shift con trascrizione di una proteina non attiva;
- ***B.01** differisce da ***A1.01** per la sostituzione di 7 basi, 4 delle quali portano alla sostituzione di 4 aa



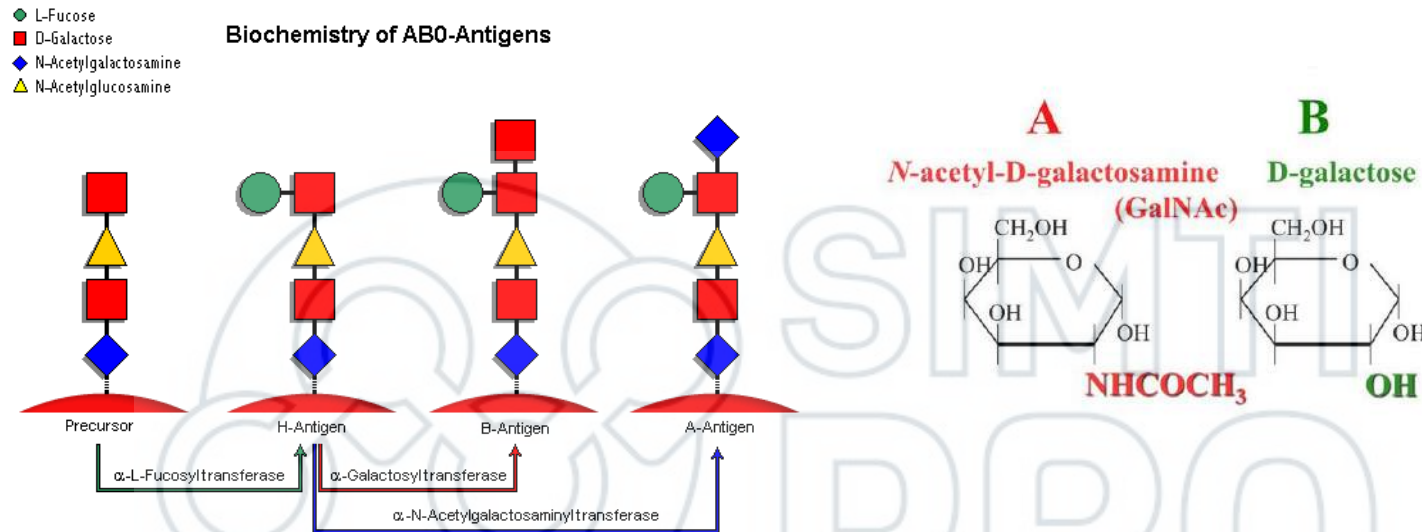
Genetica del Sistema ABO

Mutazioni in omozigosi dei geni *FUT1* o *FUT2* determinano l'assenza dell'antigene H, nelle emazie o nelle secrezioni (red-cell H-deficient o non secretori)

La contemporanea mutazione dei due geni, determina l'assenza dell'antigene H sia nelle emazie che nelle secrezioni, con formazione di un potente anti-H = **Fenotipo O_h o Bombay** (gruppo diretto O, siero agglutina con tutte le emazie eccetto fenotipi O_h)

FUT1	FUT2
668-670del (Y224del)	428G>A (W143X)
392T>C (L131P)	non trovato
1233-6674del	428G>A (W143X)
725T>G (L242R)	deleto

Biochimica del Sistema ABO

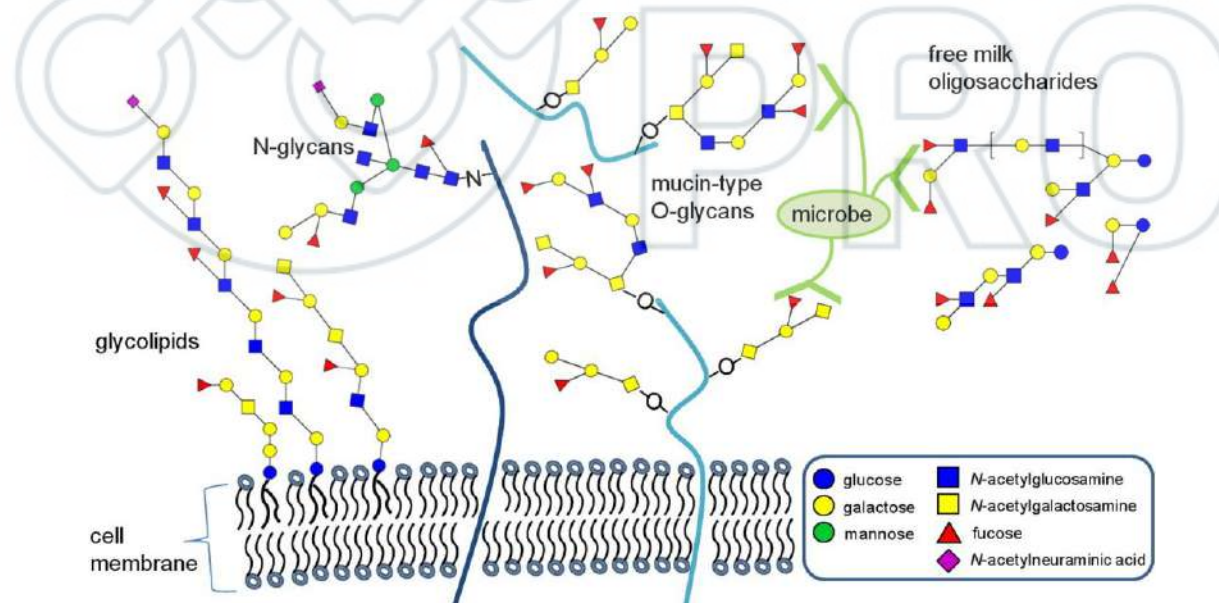


Glicosiltrasferasi: catalizzano il trasferimento di monosaccaridi specifici sul substrato accettore, l'antigene H, sintetizzato a sua volta dalla fucosilazione di un precursore ad opera di un'altra trasferasi.

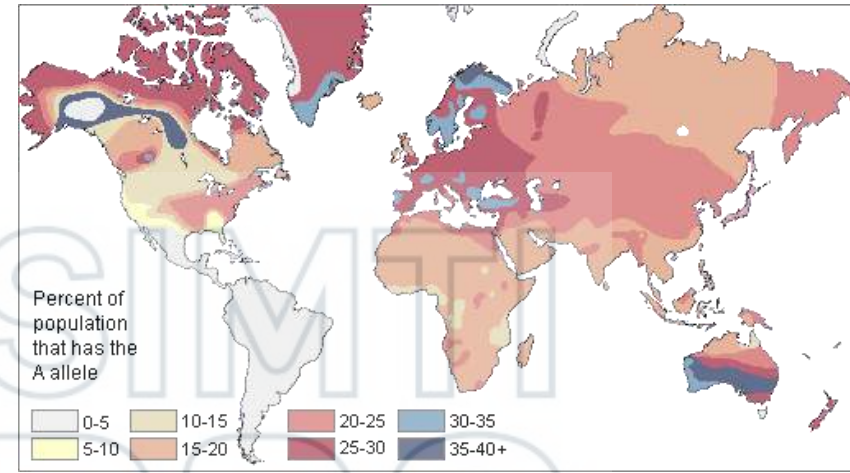
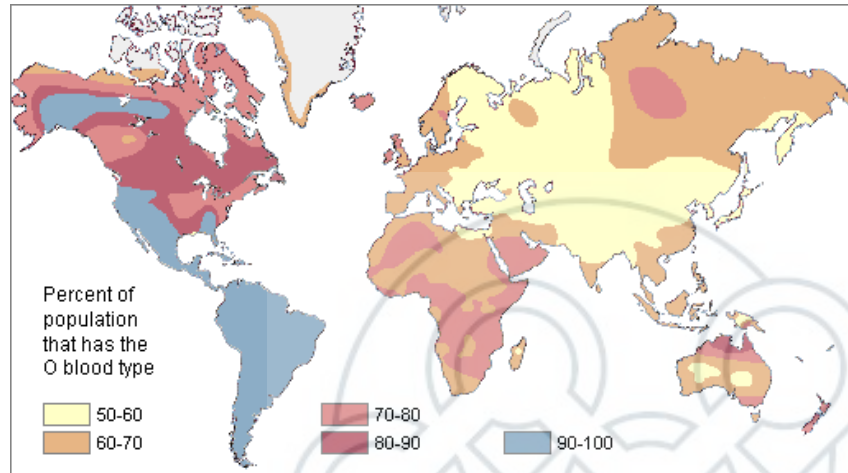
Questi monosaccaridi aggiunti alle catene oligosaccaridiche costituiscono i **determinanti antigenici** o antigeni del sistema ABO.

Antigeni ABH

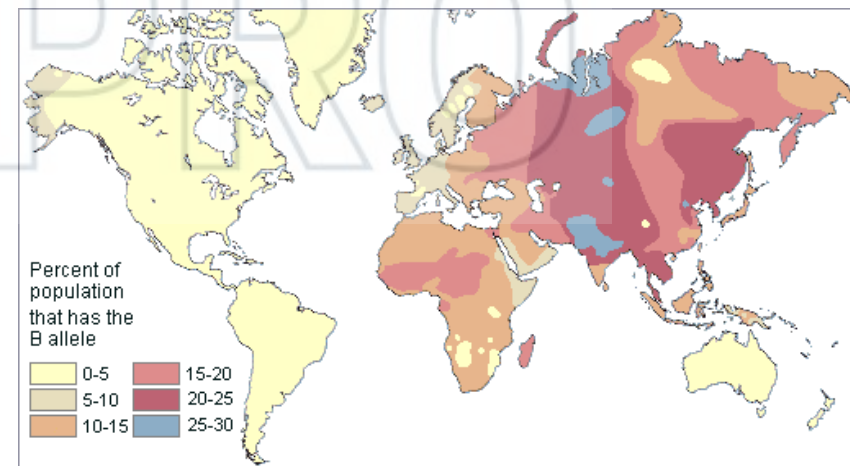
- Natura saccaridica
- Presenti già dalla 5-6 settimana di vita dell'embrione, non ben sviluppati alla nascita
- Espressione completa intorno ai **2-4 anni** di vita.
- Presenti sulla **membrana eritrocitaria** (globuli rossi, linfociti, piastrine), nei **tessuti** (endotelio vasi, epitelio organi escrezione e secrezione), nelle **secrezioni** (saliva, latte, urine, succhi gastrici, liquido seminale, fluidi di cisti ovariche)



La frequenza degli antigeni differisce nelle diverse popolazioni e gruppi etnici

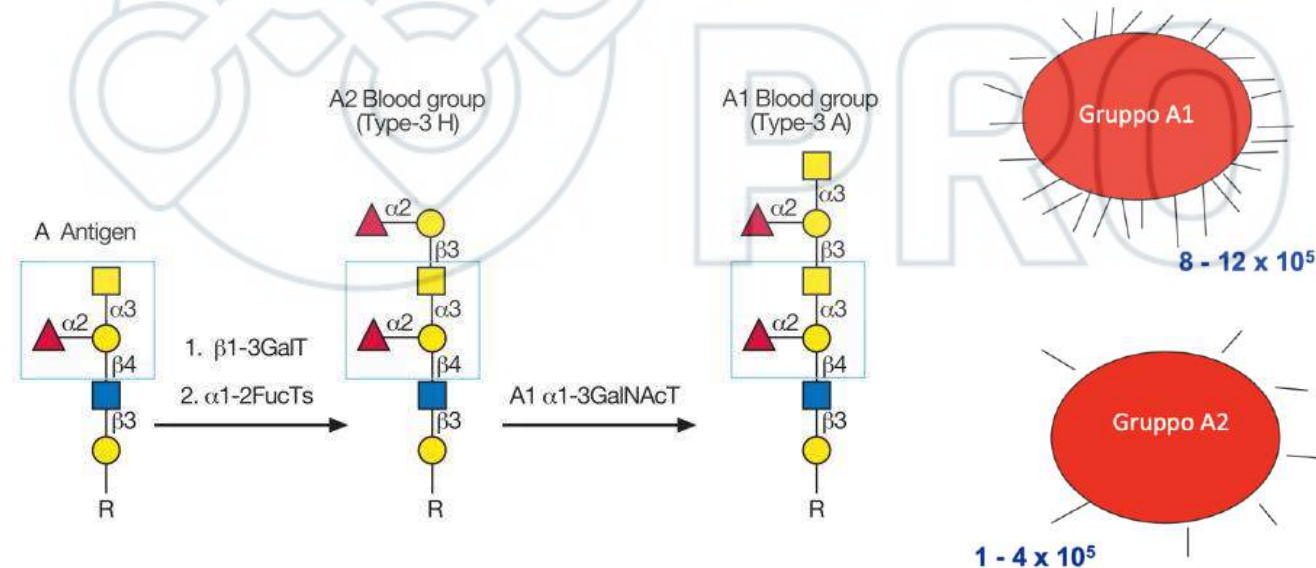


FREQUENZA	CAUCASICI	AFRICANI	ARABI	INDIANI	CINESI	GIAPPONESI	BRASILIANI
A	43%	27%	27%	21%	28%	39%	34%
B	9%	20%	16%	40%	29%	22%	14%
AB	4%	4%	4%	9%	9%	10%	3%
O	44%	49%	54%	29%	34%	29%	49%



Sottogruppi AB

- Differenze nucleotidiche rispetto al consensus
- Differenze di **quantità e forza di antigene** espresso
- Aumento dell'antigene H
- I sottogruppi di A sono più frequenti di quelli di B
- Principali sottogruppi di A sono **A₁** e **A₂** (differiscono per numero di sito antigenico per emazia)



A₁ e A₂

- Entrambe reagiscono con antisieri anti-A
- A₁ ha >A e <H; A₂ ha <A e >H
- Distinzione sierologica mediante l'uso di Lectine (proteine vegetali che legano gli zuccheri) che agglutinano le emazie:

Dolichos biflorus = anti-A₁ (agglutina globuli rossi A₁ ma non A₂)

Ulex europaeus = anti-H (0>A₂>B>A₂B>A₁>A₁B); reagisce con A₂

Fenotipo	Anti-A	Ulex europaeus	Dolichos biflorus
A ₁	+++	0	+++
A ₂	++	++	0
A ₁ B	+++	0	++
A ₂ B	+	+	0

Sottogruppi deboli A e B

Hanno attività antigenica debole e la loro classificazione sierologica non correla con quella genetica (diversi alleli>stesso fenotipo; diversi fenotipi>unico allele)

A₃, A_x, A_{int}, A_{bantu}, A_m, A_{el} **B₃, B_x, B_v, B_m, B_{el}**

Table 2 Serological details of weak subgroups of A (n = 24)

ISBT Science Series (2020) 15, 281–285

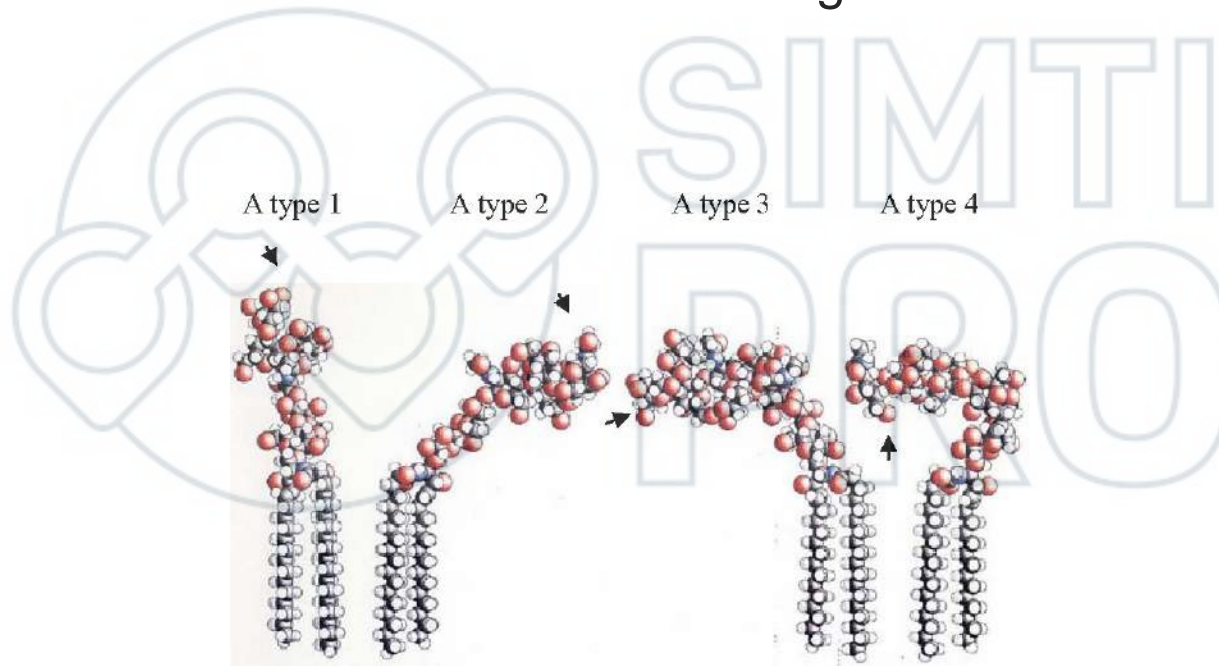
Sr. no.	Cell grouping			Serum grouping				Anti-H lectin	Anti-A1 lectin	Eluate ^a results with A cells and B cells		No. of samples	Possible weak subgroup
	Anti-A	Anti-B	Anti-AB	A _c	B _c	O _c	Autocontrol			A cells	B cells		
1	Neg	4+	4+	Neg	Neg	Neg	Neg	3+	Neg	1+	Neg	3	A _m , A _v or A _{el}
2	Neg	Neg	Neg	Neg	4+	Neg	Neg	3+	Neg	1+	Neg	3	A _m , A _v or A _{el}
3	1+	4+	4+	1+	Neg	Neg	Neg	3+	Neg	2+	Neg	1	A _x
4	Wk+	Neg	Wk+	1+	4+	Neg	Neg	3+	Neg	2+	Neg	1	A _x
5	Wk+	Neg	Wk+	Neg	4+	Neg	Neg	3+	Neg	2+	Neg	7	A ₃ , A _x or A _{end}
6	Wk+	4+	4+	Neg	Neg	Neg	Neg	3+	Neg	2+	Neg	5	A ₃ , A _x or A _{end}
7	Wk+	Neg	1+	Neg	4+	Neg	Neg	3+	Neg	2+	Neg	1	A ₃ , A _x or A _{end}
8	1+	Neg	2+	Neg	4+	Neg	Neg	3+	Neg	2+	Neg	1	A ₃ , A _x or A _{end}
9	1+	Neg	Neg	Neg	4+	Neg	Neg	3+	Neg	2+	Neg	1	A ₃ , A _x or A _{end}
10	1+	Neg	1+	Neg	4+	Neg	Neg	3+	Neg	2+	Neg	1	A ₃ , A _x or A _{end}

^aO cells were used as 'Control', which gave negative result (no agglutination) with the eluate: Wk. weak.

Sottogruppi A

A_3 - A_x - A_{end} agglutinano con anti-A (A_3 campo misto); reagiscono con anti-H; presenza occasionale di anti- A_1 nel siero.

A_y - A_m - A_{el} : non agglutinano o molto debole con anti-A; evidenziati con test di assorbimento/eluizione o biologia molecolare

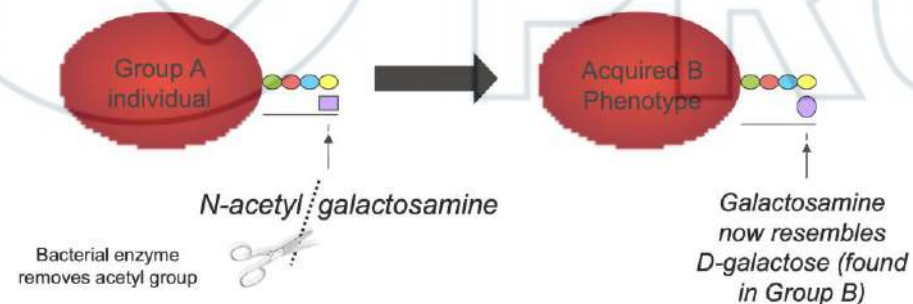


Sottogruppi B

B₃: Agglutinazione a campo misto con anti-B e anti-AB; l'attività B-trasferasi può essere ridotta fino al 90%

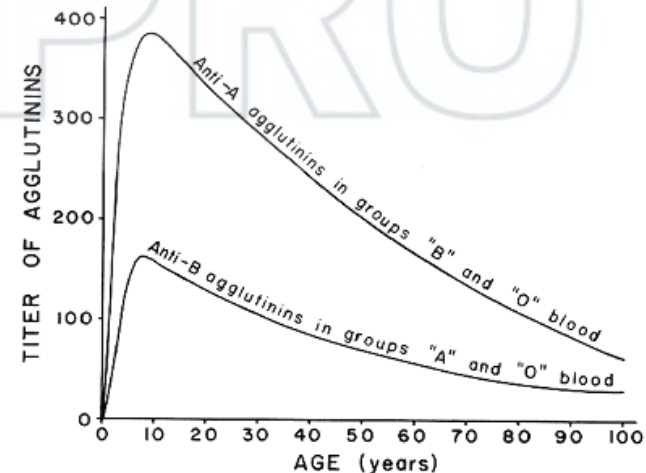
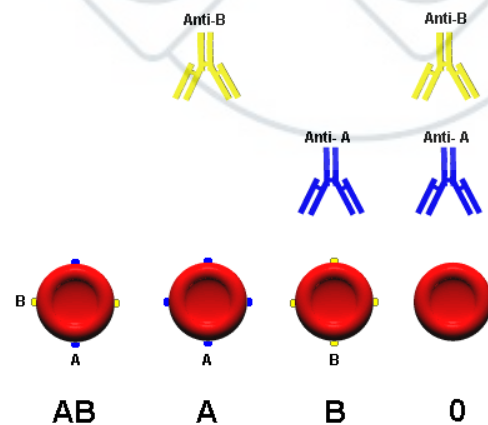
B_x- **B_m**- **B_{el}** -**B_w**: reazione debole o negativa con anti-B e anti-AB; evidenziati con test di assorbimento/eluizione o biologia molecolare

“B acquisito”: Individui A₁ acquisiscono in modo transitorio AgB. Questo fenomeno è legato alla deacetilazione della N-acetilgalattosamina per cui il determinante antigenico viene riconosciuto non più dai sieri anti-A bensì dagli anti-B (associato a pazienti con tumore al colon, infezioni da Gram-)



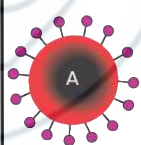
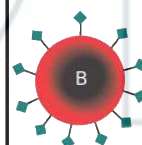
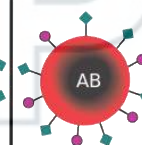
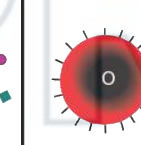
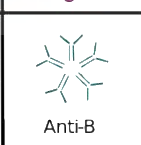
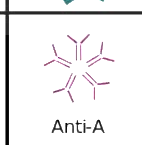
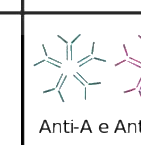
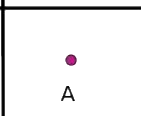


Anticorpi anti-A e anti-B

- Presenti in assenza dei corrispondenti antigeni
- Assenti alla nascita, compaiono a **3-6** mesi di vita
- Aumentano verso i 5-6 anni, fino a raggiungere un livello stabile
- Diminuiscono dopo i 65 anni
- **IgM** predominanti nei soggetti di gruppo A e B
- **IgG** predominanti nei soggetti di gruppo O
- Reagiscono a T° ambiente (20°-24°C); attivano il complemento
- Possono causare reazione emolitica
- **Anti-A₁** (2% A₂; 22-35% A₂B) non clinicamente significativo



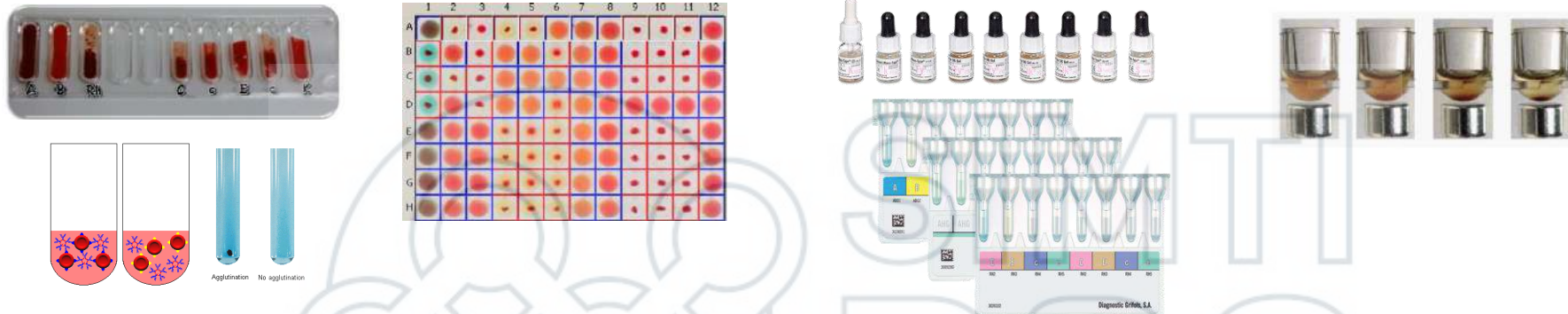
Indagini pretrasfusionali: Determinazione di gruppo ABO

- **Prova Diretta:** la presenza o l'assenza dei pertinenti antigeni è determinata dall'agglutinazione delle emazie in esame messe a contatto con gli **anticorpi anti-A, anti-B**
- **Prova Indiretta:** l'agglutinazione delle emazie-test **A₁** e **B**, con i corrispondenti anticorpi presenti nel plasma in esame, ne evidenzia o meno la presenza

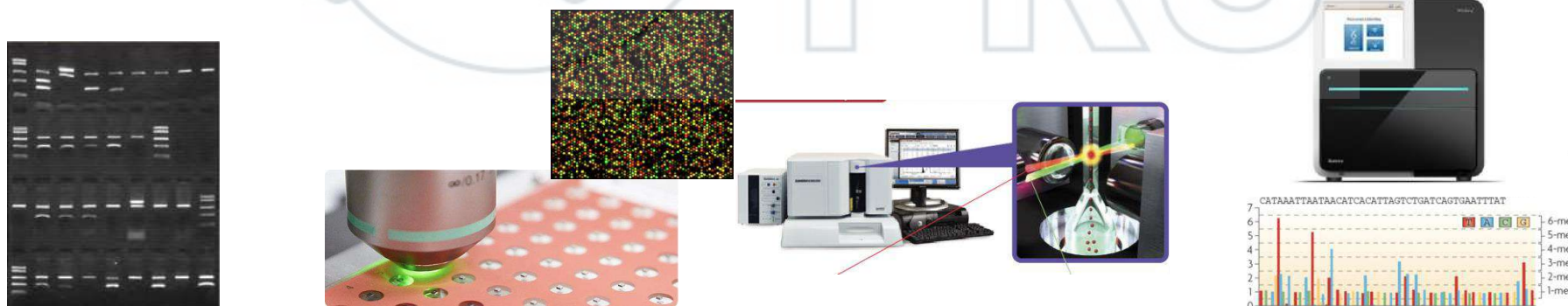
	Gruppo A	Gruppo B	Gruppo AB	Gruppo O
Tipi di GLOBULI ROSSI				
Anticorpi presenti	 Anti-B	 Anti-A	Nessuno	 Anti-A e Anti-B
Antigeni presenti	 A	 B	 A e B	Nessuno

Tecniche di Tipizzazione

Sierologia: si basano su agglutinazione; utilizzano reagenti e/o supporti di reazione differenti



Biologia Molecolare: si basano su ricerca di SNPs fino ad arrivare al completo sequenziamento; la scelta dipende dal target finale



Discrepanze ABO

- Una **discrepanza** si verifica quando **i risultati del test diretto non concordano con quelli del test indiretto**, o quando la tipizzazione corrente non corrisponde a una precedente.
- Può essere sospettata in presenza di **reazioni deboli o assenti, reazioni addizionali, reazioni anomale**
- Le cause possono essere **errori tecnici** (clerical errors, errori metodologici, errori procedurali) o **caratteristiche del campione** (globuli rossi o siero)
- Discrepanza **sierologico/molecolare**



Discrepanze ABO: errori tecnici

Clerical errors:

- ✓ etichettatura provette
- ✓ Identificazione del paziente
- ✓ Errata registrazione

Errori metodologici (reagenti e strumenti):

- ✓ Utilizzo reagenti scaduti
- ✓ Reagenti contaminati
- ✓ Strumentazioni non qualificate

Errori procedurali:

- ✓ Mancato rispetto procedura



- ✓ Ripetere il test
- ✓ Richiedere nuovo campione
- ✓ Cambiare reagenti

Discrepanze ABO: errori legati al campione

Emazie	Causa	Possibile soluzione
Reazioni negative o deboli	<ul style="list-style-type: none">-Sottogruppi ABO-Patologie (Leucemie)	<ul style="list-style-type: none">-Prolungare tempo incubazione-Studi assorbimento-eluzione-Utilizzo Ab monoclonali e anti-H-Tipizzazione molecolare
Reazioni a campo misto	<ul style="list-style-type: none">-Trasfusioni-Trapianto-Chimerismo-A₃ o B₃	<ul style="list-style-type: none">-Anamnesi-Utilizzo Ab monoclonali-Tipizzazione molecolare
Reazioni positive inattese	<ul style="list-style-type: none">-Poliagglutinabilità-Impilamenti-Fenotipo B acquisito-AutoAb freddi	<ul style="list-style-type: none">-Lavare emazie-Utilizzo Enzimi proteolitici-Utilizzo Ab monoclonali-Testare a caldo

Discrepanze ABO: errori legati al campione

Siero	Causa	Possibile soluzione
Reazioni negative o deboli	<ul style="list-style-type: none">-Età-Sottogruppi A o B-Ipogammaglobulinemia-Trapiantati-Immunodepressi (malattia o terapia)	<ul style="list-style-type: none">-Anamnesi (età e diagnosi)-Prolungare t incubazione-Testare a +4°C
Extra anticorpi	<ul style="list-style-type: none">-Anti-A1 in soggetti A₂ o A₂B-Auto/Allo-anticorpi freddi-Eccesso proteine sieriche (mieloma)	<ul style="list-style-type: none">-Uso lectina anti-A₁-Eseguire identificazione Ab-Sostituzione

Retrospective analysis of forward and reverse ABO typing discrepancies among patients and blood donors in a tertiary care hospital

Transfusion Medicine, 2019, 29, 103–109

R. N. Makroo, B. Kakkar,  S. Agrawal, M. Chowdhry, B. Prakash & P. Karna

Campioni analizzati:

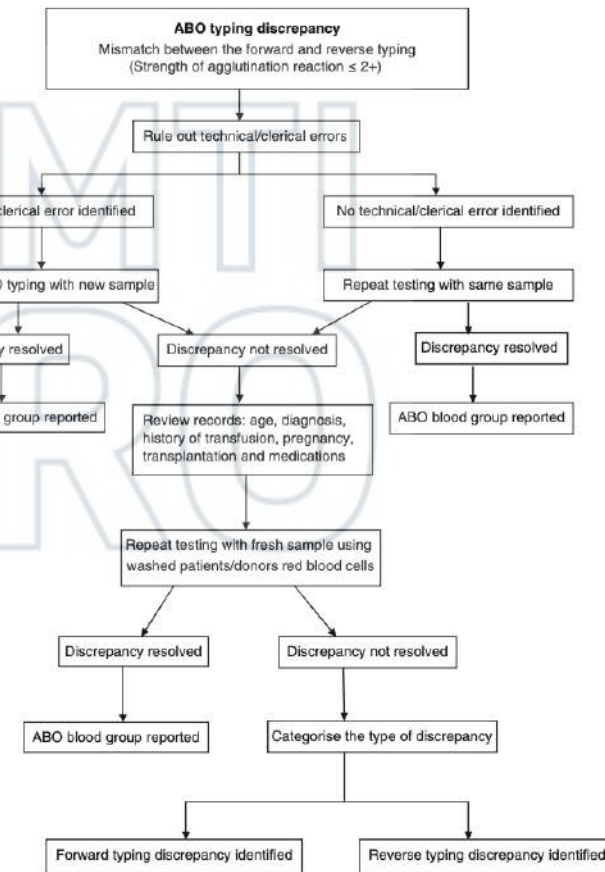
- ✓ 135.853 pazienti
- ✓ 62.080 donatori

Incidenza discrepanza:

- ✓ 0.1% pazienti
- ✓ 0.02% donatori

Tipologia discrepanza:

- ✓ Prova indiretta: autoanticorpi freddi
- ✓ Prova diretta: sottogruppi ABO



Tipologia Discrepanza ABO: donatori vs riceventi

Table 1. Forward and reverse ABO typing in blood donors vs patients

	Blood donors	Patients
Forward typing discrepancy		
Discrepant samples (n; %)	4 (29%) ←	17 (12.3%) ←
Cause of discrepancy	Weak antigen reactivity (subgroup of A ¹)	Weak antigen reactivity (13 subgroup of A ¹ ; 3 subgroup of AB; 1 subgroup of B)
Reverse typing discrepancy		
Discrepant samples (n, %)	10 (71%) ←	118 (87.7%) ←
Cause of discrepancy	Cold-reacting autoantibody (8; 57%) Weak antibody (1; 7%) Cold-reacting alloantibody (1; 7%, anti-M)	Cold-reacting autoantibody (70; 50.7%) Weak antibody (35; 25.4%) Cold-reacting alloantibody (6; 4.3%; 3 anti-M; 2 anti-N; 1 anti-Le ^b) Warm-reacting autoantibody (3; 2.2%) anti-A1 antibody (3; 2.2%; 2 subgroup of AB; 1 subgroup of A) Bombay group (2; 1.5%) Rouleaux (1; 0.7%) Post-minor ABO-incompatible stem cell transplant recipient (1; 0.7%; patient group A; donor group O)

¹Subgroup of A – were A2 type.

ORIGINAL PAPER

ABO blood grouping discrepancies in the donor population

Ashish Jain, Sachin Garg, Neelam Marwaha & Ratti Ram Sharma

Department of Transfusion Medicine, Postgraduate Institute of Medical Education and Research, Chandigarh, India

Incidenza discrepanza:

✓ 0.064% donatori

Prevalence and rate as a fraction of

ABO discrepancies
(n = 93)

Total donations
(n = 144 279)

S. No.	ABO discrepancies	Total number (n = 93)	ABO discrepancies (n = 93)		Total donations (n = 144 279)	
			Prevalence (%)	Rate	Prevalence (%)	Rate
1	Group I discrepancy	57	61.3	1 in 1.63	0.04	1 in 2531
	Weak anti-A antibody	24	25.8	1 in 3.88	0.017	1 in 6011
	Weak anti-B antibody	33	35.5	1 in 2.82	0.023	1 in 4372
2	Group II discrepancy	29	31.2	1 in 3.21	0.02	1 in 4975
	Weak subgroups of A	24	25.8	1 in 3.88	0.017	1 in 6011
	Weak subgroups of B	5	5.4	1 in 18.6	0.003	1 in 28 856
3	Group IV discrepancy	7	7.5	1 in 13.29	0.005	1 in 20 611

Genotipizzazione ABO mediante NGS

NGS è il miglior metodo per definire un sottogruppo ABO: supera limiti delle metodiche molecolari tradizionali (PCR-SSP o real-time PCR) che identificano alleli comuni, **analizzando l'intero gene** e rilevando così le associazioni cis/trans delle nuove varianti con gli alleli ABO.

TABLE 2. Four control samples and 20 of 22 subtype samples accurately identified using NGS including 17 samples analyzed through phasing

Sample	Phenotype	ABO serology				Genotype by Exon 6 + Exon 7 RFLP	NGS		Sanger sequence	
		Anti-A	Anti-B	A cell	B cell		Allele 1 (ABO*)	Allele 2 (ABO*)	B allele ASP-PCR	Exon 6-7 RFLP
Normal ABO										
A		4+	0	0	≥3+	A/O	A1.02	O.01.01		V
B		0	4+	≥3+	0	B/O	B.01	O.01.01	V	
O		0	0	≥3+	≥3+	O/O	O.01.01	O.01.02		V
AB		4+	4+	0	0	AB	A1.02	B.01	V	
ABO subtype										
Phased samples										
1	AB ₃	4+	2+	0	1+	A/B	A1.02	B3.06*	Y	
2	A _u B	el(+)	4+	1+	0	AB	AEL.02*	B.01	Y	
3	AB ₃	4+	3+mf	0	1+	AB	A1.02	BW.12*	Y	
4	A _u B	el(+)	4+	1+	0	AB	AEL.04*	B.01	Y	
5	A ₂ B	4+	4+	0	0	AB	A2.05*	B.01	Y	
6	A ₃ B	3+mf	4+	1+	0	AB	A1.02+c.595C>T†	B.01	Y	
7	A ₃ B	3+mf	4+	1+	0	AB	A2.08*	B.01	Y	
8	A _u B	el(+)	4+	1+	0	AB	AW.04*	B.01	Y	
9	A _u B	el(+)	0	2+	4+	A/O	AW.35*	O.01.01		Y
10	A _u	el(+)	0	±	4+	A/O	AEL.04*	O.01.01		Y
11	O	el(0)	0	2+	4+	A/O	AEL.02*	O.01.02		Y
12	A _u	el(+)	0	±	4+	A/O	AEL.04*	O.01.02		Y
13	B subtype	0	el(+)	4+	2+	B/O	BEL.03*	O.01.02	Y	
14	B subtype	0	1+	4+	1+	B/O	BW.27*	O.01.02	Y	
15	B _u	0	el(+)	4+	1+	B/O	BEL.03*	O.01.01	Y	
16	O	0	el(0)	3+	2+	B/O	BEL.03*	O.01.02	Y	
17	A _u	±	0	0	4+	O/O	O.01.02 + 5% A1.02‡	O.01.02		Y
Unphased samples§										
18	A _u	el(+)	0	1+	4+	A/O	A1.02(c.28 + 5443_29-1655del)*	O.01.02		V
19	B ₃	0	3+mf	3+	0	B/O	B3.03*	O.01.01	V	
20	B ₃	0	2+mf	4+	0	B/O	B3.03*	O.01.01	V	
Unresolved samples										
21	AB ₃	4+	4+mf	0	0	AB	A1.02	B.01	V	
22	A ₂ B	4+	4+	0	0	AB	A1.02	B.01	V	
Non-ABO subtype, weakening antibody presentation										
23	O	0	el(0)	4+	2+	O/O	O.01.01	O.01.02		V
24	B	el(0)	4+	1+	0	B/O	B.01	O.01.01		V

ABO genotyping with next-generation sequencing to resolve heterogeneity in donors with serology discrepancies

P.C.Wu et al.

Transfusion 2018; 58:2232-2242.



Application of Blood Group Genotyping by Next-Generation Sequencing in Various Immunohaematology Cases

T.Y. Kim et al.

Transfus Med Hemother. 2022 Apr; 49(2): 88–96.

Table 1. Results of serological testing and molecular testing (including NGS)

Forward typing				Reverse typing			Adsorption and elution		Genotype	
Anti-A	Anti-B	Anti-A,B	Anti-H	A ₁ cell	B Cell	O Cell	A ₁ cell	B Cell	allele 1	allele 2
0	0	0	4+	0	4+	0	2+	0	<i>ABO*O.01.01</i>	<i>ABO*A1.02</i> with c.29-10T>G

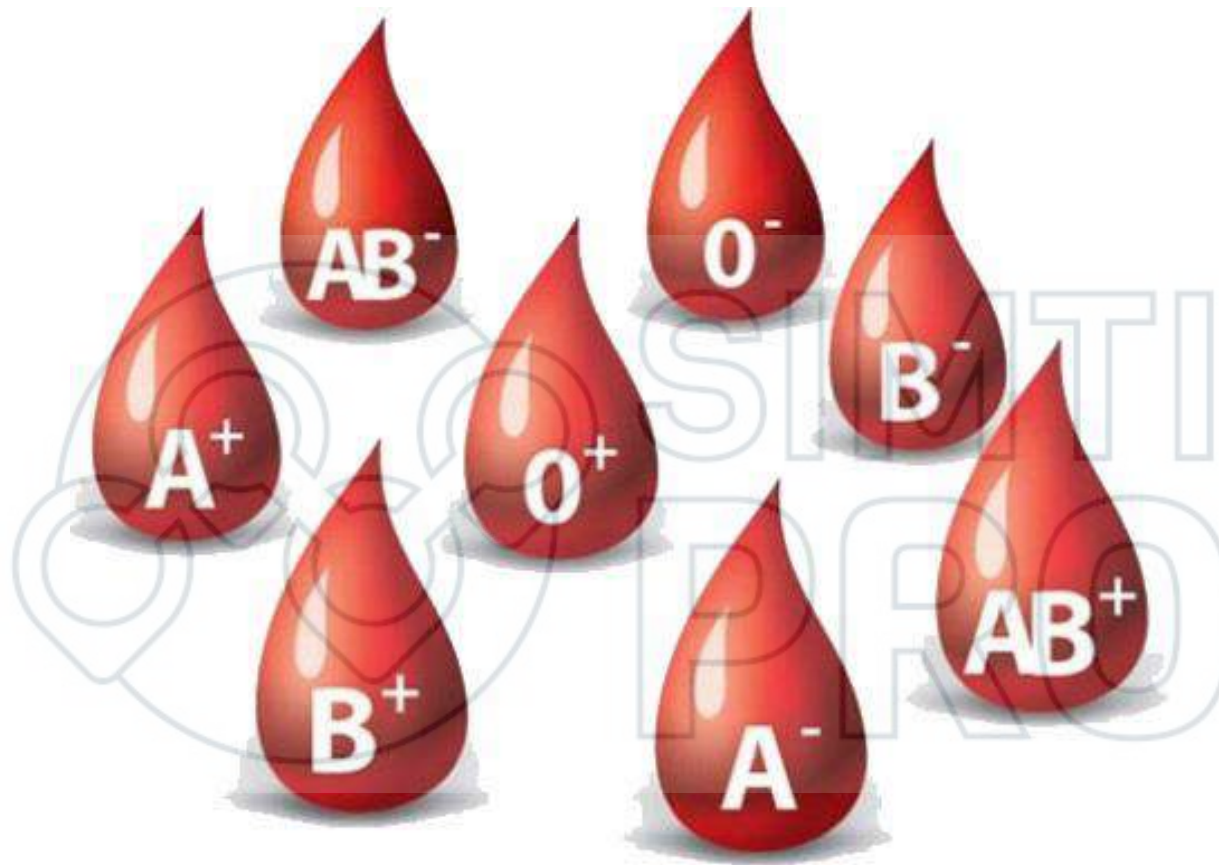
Con sequenziamento **NGS** sono state esaminate tutte le regioni esoniche ed introniche del gene in un unico test ed è stata identificata una **nuova variante eterozigote nell'introne 1 (c.29-10T>G)**, responsabile dell'espressione debole dell'antigene.



Conclusioni



- Discrepanza di gruppo ABO non vai **mai sottovalutata** e **deve essere risolta**
- Analisi del processo diagnostico, **valutazione degli errori e delle cause**
- Utilizzo di tutte le **metodiche sierologiche e molecolari** a disposizione per garantire accuratezza tipizzazione
- Atteggiamento **precauzionale** in attesa della risoluzione della discrepanza (trasfondere O, non etichettare unità)
- Fine ultimo è la **sicurezza trasfusionale** e la **salute del paziente**



Grazie per l'attenzione