

**IMPORTANZA CLINICA DELLA TIPIZZAZIONE
SIEROLOGICA E MOLECOLARE DELLE VARIANTI
DELL'ANTIGENE RhD**

Relatore

Ch.ma Dott.ssa Caponi Laura

Candidato

Catapano Piera

Matr. 475606

Sommario

1. INTRODUZIONE.....	1
2. IL SISTEMA Rh.....	4
2.1 La scoperta del sistema Rh.....	4
2.2 Geni Rh	5
2.3 Variabilità del D	9
2.3.1 D parziale.....	9
2.3.2 D debole.....	11
2.3.3 Rh null	12
3. SCOPO DELLO STUDIO	15
4. MATERIALI E METODI.....	18
4.1 Test di Coombs.....	19
4.2 Agglutinazione in gel su micro colonna.....	21
4.3 PCR-SSP	25
5. RISULTATI	27
6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	30
7. BIBLIOGRAFIA	35

Indice delle Tabelle

Tabella 1: Antigeni del sistema Rh.....	6
Tabella 2: Mutazioni presenti nei fenotipi D-Weak	12
Tabella 3: Gestione raccomandata per la trasfusione e la somministrazione di immunoglobuline in pazienti con fenotipo D weak e D partial	17
Tabella 4: Risultati sierologici e molecolari dei 56 campioni risultanti positivi al test del Du.	27

Indice delle Figure

Figura 1: Rappresentazione schematica dei geni RHD e RHCE e delle proteine RhD e RhCE.	7
Figura 2: Rappresentazione schematica dei geni di alcune varianti dell'antigene D. Il gene è rappresentato da 10 quadrati, ognuno dei quali indica un esone: gli esoni originati dal gene RHD sono verdi, quelli originati dal gene RHCE sono rosa.....	10
Figura 3: Test di Coombs diretto ed indiretto.....	21
Figura 4: Si introducono in ogni camera delle colonne 50 µL di una sospensione allo 0,8% di eritrociti (in tampone LISS) del paziente e 25 µL di ciascun anticorpo monoclonale anti-D. Si incuba la schedina a 37°C per 15 minuti e dopo si centrifuga a 910 rpm (85 G) per 10 minuti.....	23
Figura 5: Master List.....	24

ABBREVIAZIONI

Ab: anticorpo

AABB: American Association of Blood Banks

DAI: Dipartimento ad Attività Integrata

Rpm: Revolution Per Minute – Rivoluzione Per Minuto

EDTA: acidoetilendiamminotetraacetico

PCR: Polymerase Chain Reaction SSP: Sequence Specific

Priming TAQ: Thermus Aquaticus

TCD: Test del Coombs Diretto

TCI: Test del Coombs Indiretto

MEN: Malattia Emolitica del Neonato

MEA: Malattia Emolitica Autoimmune

SIT: Servizio di Immunoematologia e Trasfusione

1. INTRODUZIONE

Il sistema Rh, dopo quello ABO, è il sistema gruppo-ematico eritrocitario più immunogeno dell'uomo. Infatti all'esecuzione del gruppo ABO si accompagna sistematicamente la contemporanea determinazione del fenotipo Rh.

L'antigene più importante del sistema Rh, l'antigene D, è molto più efficace di qualunque altro antigene eritrocitario nel determinare una risposta anticorpale quando venga introdotto in un soggetto che ne è privo. Esso è presente sugli eritrociti dell'85% delle persone di razza bianca ed in percentuale ancora più alta in quelle di razza nera (1).

Gli individui i cui globuli rossi possiedono l'antigene D vengono definiti Rh positivi, quelli che mancano dell'antigene D vengono detti Rh negativi.

Quindi dopo gli antigeni A e B, il D è il più importante nella pratica trasfusionale. Diversamente dagli antigeni A e B, tuttavia, le persone che non possiedono l'antigene D sui propri eritrociti non presentano, regolarmente, l'anti-D. La formazione dell'anticorpo anti-D origina dall'esposizione, per motivi trasfusionali o gravidanze, ad emazie che presentano l'antigene D.

E' stato stimato che dal 30 all'85% delle persone D negative che ricevono una trasfusione D positiva svilupperà l'anti-D. Per questo motivo, tutti i riceventi e tutti i donatori di sangue vengono esaminati, nelle procedure di routine, per la presenza dell'antigene D, al fine di assicurare che i riceventi D negativi vengano identificati e ricevano sangue D negativo (1).

L'antigene D è stato da sempre oggetto di studio dell'immunoematologia. L'interesse verso tale antigene è aumentato dopo la scoperta che alcuni individui RhD positivi producevano in seguito a trasfusioni anticorpi (Ab) anti-D. Successivi studi portarono alla scoperta del mosaicismismo dell'antigene RhD e rivelarono la sua grande variabilità (D partial e D weak).

In passato, i limiti delle metodiche sierologiche non consentirono di identificare le molte varianti dell'antigene D, che perciò venivano identificate come D negativo. Questo non rappresentava un problema nell'individuo ricevente la trasfusione, dato che veniva trasfuso con sangue RhD negativo (come riceventi alcune varianti sono tutt'ora trattate come RhD negative), ma creava un problema se l'individuo era un donatore di sangue, in quanto i soggetti D variant, possono determinare nel ricevente RhD negativo la produzione di alloanticorpi (ad esempio DVI).

La corretta identificazione delle varianti dell'antigene RhD è fondamentale anche per le donne gravide RhD negative, in quanto vanno sottoposte ad immunoprofilassi se il neonato è un D variant e quindi può stimolare la produzione di anticorpi che potrebbero causare una malattia emolitica del neonato (MEN) in una successiva gravidanza con feto RhD positivo.

Nei servizi trasfusionali (SIT) nasce quindi l'esigenza di dover correttamente tipizzare individui che, dai test sierologici, risultano negativi, in modo da determinare possibili D variant per evitare alloimmunizzazioni da trasfusione e programmare immunoprofilassi MEN nelle donne gravide quando richiesto.

Attualmente, tuttavia, grazie all'introduzione di nuove metodiche, è possibile sopperire ai limiti della sierologia, che resta comunque l'indagine di base principale ed imprescindibile.

Il test di tipizzazione molecolare, ad oggi, è l'unico che permette di ottenere una genotipizzazione del paziente, per individuarne con esattezza la variante RhD. Tuttavia è utilizzato solo come supporto e comparazione per l'indagine sierologica, perché pur essendo molto affidabile e pur permettendo di risolvere risultati incerti od indefiniti di quest'ultima, ha costi e tempi di esecuzione maggiori e la sua esecuzione richiede laboratori attrezzati e personale altamente specializzato.

Sia per questioni economiche che pratiche, è usato di routine il test sierologico, sebbene sia auspicabile, in futuro, la messa a punto e l'utilizzo di test più precisi ed affidabili che consentano il superamento dei limiti attuali.

2. IL SISTEMA Rh

2.1 La scoperta del sistema Rh

La scoperta del sistema Rh si deve a Levine P. e Stetson R.E. (2) che nel 1939 avevano descritto un caso di una secondipara che aveva partorito un feto morto. La paziente aveva avuto un'emorragia post-partum ed era stata trsfusa col sangue del marito di gruppo O come lei. La trasfusione determinò una violenta reazione emolitica.

Levine P. e Stetson R.E. constatarono che il siero della donna agglutinava circa l'80% dei campioni di sangue ABO-compatibili esaminati. Essi dedussero che la donna doveva essersi immunizzata con un antigene eritrocitario presente sui globuli rossi del feto che, a sua volta, aveva ereditato dal padre. Questo spiegava la grave reazione emolitica della donna dopo aver ricevuto sangue dal marito.

Un anno più tardi, Landsteiner K. e Wiener A.S. (3) immunizzarono conigli e cavie con emazie di *Macacus Rhesus* ed ottennero sieri che reagivano con l'85% dei campioni di sangue appartenenti a soggetti della popolazione bianca di New York. Queste reazioni erano indipendenti da ogni altro sistema di gruppo allora noto (ABO, MN, P). Era stato quindi individuato un nuovo determinante antigenico dei globuli rossi umani al quale fu dato il nome di fattore Rhesus.

Inizialmente, sia all'anticorpo umano che a quello di coniglio fu dato il nome di anti-Rh, dato che c'era un'alta percentuale di reazioni positive ottenute sia con i sieri di coniglio anti-Rhesus che col siero umano. Ciò fece pensare ad una stessa specificità per i due anticorpi (3).

Ulteriori studi, dimostrarono che l'anticorpo animale e quello di

coniglio erano diretti verso antigeni correlati ma distinti (4).

Oggi l'antigene umano contro cui è diretto l'anticorpo anti-Rhesus è conosciuto come LW, ribattezzato così dalle iniziali dei due scopritori (Landsteiner K. e Wiener A.S.) (3). Studi familiari hanno rivelato che l'antigene D è geneticamente determinato e la trasmissione del carattere è autosomica dominante (3).

2.2 Geni Rh

Furono condotti molti studi per cercare di spiegare il controllo genetico dell'espressione degli antigeni Rh e molti di questi furono controversi (5) (6).

L'utilizzo di antisieri monoclonali, associati a studi molecolari, ha portato all'identificazione di 56 antigeni del sistema Rh, anche se alcuni di essi sono da considerarsi obsoleti e dovrebbero essere eliminati dalla lista internazionale (tabella 1).

La Tippett P. (7) nel 1986 predisse che a determinare la produzione di antigeni Rh fossero due loci strutturali tra loro strettamente concatenati. La teoria si dimostrò corretta.

I due loci RH sono RHD e RHCE, che portano i geni per la codifica del polipeptide D e di quelli della serie CE (C, c, E, e) rispettivamente. Entrambi sono situati sul braccio corto del cromosoma 1, in posizione p.36.13-p34 (8). Ciascun gene è organizzato in 10 esoni distribuiti su 75 kb di DNA con sequenze nucleotidiche omologhe al 96% (9).

Diversi studi hanno dimostrato che nei soggetti RhD negativi caucasici non è presente alcun gene al locus RHD. Il DNA proveniente da emazie RhD negative offriva patterns di digestione ridotti rispetto al DNA ottenuto da emazie RhD positive, in quanto veniva a mancare il frammento addizionale presente nei soggetti RhD positivi. In altre popolazioni il fenotipo RhD negativo è associato ad un gene RHD inattivo, mutato o parziale (10).

Tabella 1: Antigeni del sistema Rh

Designazione numerica	Nome dell'antigene	Incidenza (%)*			Designazione numerica	Nome dell'antigene	Incidenza (%)*		
		Bianchi	Neri	Totale			Bianchi	Neri	Totale
Rh1	D	85	92		Rh32	Rh32	<0,01	1	
Rh2	C	68	27		Rh33	Har			<0,01
Rh3	E	29	22		Rh34	Bastiaan			>99,9
Rh4	c	80	96		Rh35	Rh35			<0,01
Rh5	e			98	Rh36	Be ^a			<0,1
Rh6	f	65	92		Rh37	Evans			<0,01
Rh7	Ce	68	27		Rh39	C-like			>99,9
Rh8	C ^w	2	1		Rh40	Tar			<0,01
Rh9	C ^x			<0,01	Rh41	Ce-like	70		
Rh10	V	1	30		Rh42	Ce ^s	<0,1	2	
Rh11	E ^w			<0,01	Rh43	Crawford			<0,01
Rh12	G	84	92		Rh44	Nou			>99,9
Rh17	Hr ₀			>99,9	Rh45	Riv			<0,01
Rh18	Hr			>99,9	Rh46	Rh46			>99,9
Rh19	hr ^s			98	Rh47	Dav			>99,9
Rh20	VS	<0,01	32		Rh48	JAL			<0,01
Rh21	C ^G			68	Rh49	STEM	<0,01	6	
Rh22	CE			<1	Rh50	FPTT			<0,01
Rh23	D ^w			<0,01	Rh51	MAR			>99,9
Rh26		80	96		Rh52	BARC			<0,01
Rh27	cE	28	22		Rh53	JAHK			<0,01
Rh28				<0,01	Rh54	DAK			<0,01
Rh29	total Rh			>99,9	Rh55	LOCR			<0,01
Rh30	Go ^a	0	<0,01		Rh56	CENR			<0,01
Rh31	hr ^B			98					

I polipeptidi codificati dai geni del locus RH sono proteine palmitolate di 417 aminoacidi, con sequenze omologhe tra loro per il 92% ed un PM tra 30 e 32 kDa. I polipeptidi sono fortemente idrofobi e presentano 12 domini che attraversano la membrana, regolarmente spazati e collegati fra loro da loops idrofilici, ognuno dei quali è costituito da meno di 20 aminoacidi. Sia il dominio carbossilico terminale che quello aminico della catena polipeptidica sono intracitoplasmatici; e questa localizzazione sembra favorire l'instaurarsi di un forte legame alla membrana eritrocitaria (11), con conseguente insensibilità degli antigeni Rh alla digestione enzimatica (Figura 1).

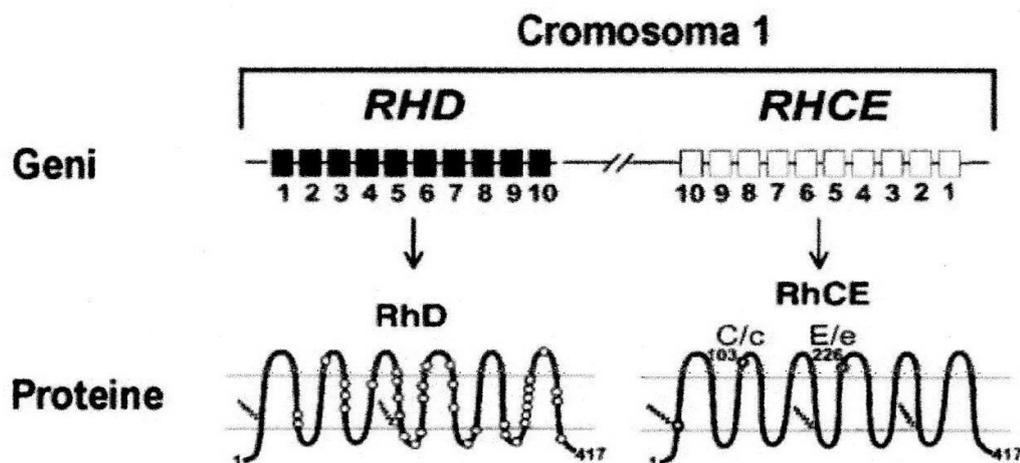


Figura 1: Rappresentazione schematica dei geni RHD e RHCE e delle proteine RhD e RhCE.

I polipeptidi sono legati ad acidi grassi e, a differenza di molte proteine associate ai gruppi sanguigni, non presentano residui glicidici. Esiste un'elevata omologia tra i prodotti dei geni RHD e RHCE; i prodotti dei differenti alleli del gene RHCE sono ancora più simili. Gli antigeni C e c si differenziano uno dall'altro solamente per 4 aminoacidi nelle posizioni 16, 60,

68 e 103; di queste differenze, solo quella tra la serina e la prolina nella posizione 103 sembra essere l'elemento critico. La presenza della prolina o dell'alanina in posizione 226 differenzia E da e. Il polipeptide D, diversamente, possiede da 32 a 35 aminoacidi che sarebbero percepiti come estranei dai soggetti D negativi (12).

Gli antigeni Rh per potersi esprimere, devono legarsi, non covalentemente, con alcune proteine glicosilate di membrana, pur mantenendo al polipeptide la funzione di conferire la specificità antigenica. I glicopeptidi a cui le proteine Rh si legano sono le glicoproteine CD47, RhAG e LW, nonché la glicoforina B. La glicoproteina CD47 ha larga diffusione tissutale. La sua funzione sulle emazie è ignota, ma il basso livello di esse sulle membrane Rh deficienti fa pensare ad una relazione con l'espressione dell'antigene D (13). La glicoproteina RhAG consta di 409 aminoacidi organizzati in 12 domini che attraversano il doppio strato lipidico ed ha caratteristiche molto simili a quelle dei polipeptidi Rh. Il gene è posto sul braccio corto del cromosoma 6 e presenta omologia con i geni RH pari al 36% (14). La glicoproteina RhAG gioca un ruolo cruciale nel vincolare il polipeptide Rh alla membrana eritrocitaria. Mutazioni a livello di questo gene sono alla base del fenotipo Rhnull di tipo regolatore (15). Le glicoproteine LW e glicoforina B fanno parte di altri sistemi gruppo-ematici, ma hanno relazioni con l'espressione del sistema Rh. Gli antigeni LW si esprimono diversamente in base ai diversi fenotipi Rh, mentre la glicoforina B che dà la specificità S/s e U risulta fortemente diminuita in soggetti Rhnull (16). Ciò vale anche per il sistema Duffy, in quanto l'antigene Fy5 è assente nei soggetti Rhnull e poco espresso in quelli D--.

2.3 Variabilità del D

2.3.1 *D parziale*

L'antigene D è un mosaico antigenico composto da almeno 9 epitopi (epD1-epD9) (17). L'epitopo è una porzione di antigene che reagisce con una singola popolazione anticorpale specifica. Alcune classificazioni sierologiche con anticorpi monoclonali hanno poi consentito l'identificazione di almeno 30 epitopi, e quindi era stata proposta una nuova classificazione. epD1-epD30 (18). Il modello a nove epitopi, data la sua grande schematicità, continua a testimoniare efficacemente le diverse reattività sierologiche del più importante antigene Rh.

La scoperta del mosaicismo del D nasce dal fatto che alcuni individui D positivi sono in grado di sviluppare anticorpi contro il D se trasfusi.

Nel 1989 Lomas C. et al. (19) definirono l'esistenza di almeno 7 epitopi (epD1-epD7). Gli epitopi 6 e 7 però fornirono risposte identiche con alcuni anticorpi monoclonali e quindi furono definiti epD6/7. Successivamente Lomas C. et al. (20) identificarono anche l'epD8, l'epD9 e le varianti DFR e DBT.

Da allora, molte varianti sono state identificate, ed il modello originale è stato ampliato per giungere all'attuale di 30 epitopi stabilito nel 2001 durante il Fourth International Workshop Monoclonal Antibodies Against Human Red Cell Surface Antigens (21).

Le emazie alle quali mancavano uno o più epitopi furono denominate D mosaic o D variant ed oggi sono note come D parziali (1). Queste particolari emazie sono state, in genere, individuate in seguito alla produzione di anticorpi verso gli epitopi mancanti. Studi molecolari hanno messo in evidenza i meccanismi che danno luogo ai vari fenotipi. Si formano o per ricombinazione tra i geni RHD e RHCE con formazione di

ibridi (Figura 2), oppure da delezione genica o mutazioni puntiformi e non senso nel gene RHD.

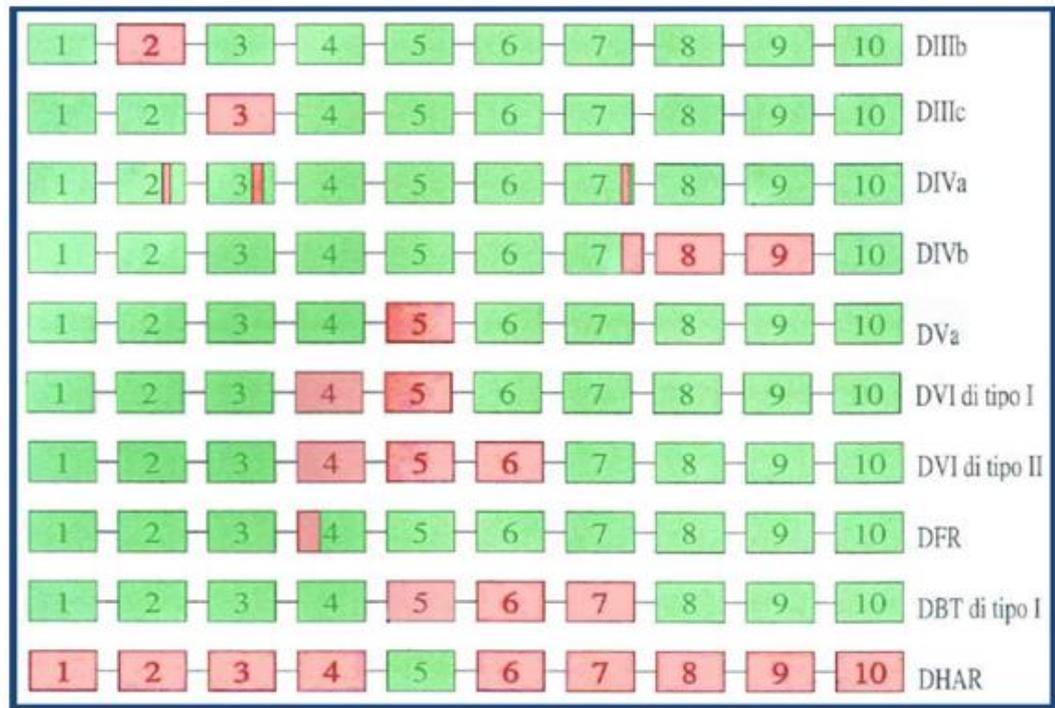


Figura 2: Rappresentazione schematica dei geni di alcune varianti dell'antigene D.

Ad esempio nella variante DVI di tipo II gli esoni 4, 5 e 6 di RHD sono sostituiti con la regione equivalente del gene RHCe. La proteina quindi consta comunque di 417 aminoacidi come la RHD che non subisce riarrangiamenti. Esiste anche una variante DVI in cui gli esoni 4, 5 e 6 sono deleti ed il polipeptide è di 266 aminoacidi (22). Nel DVI di tipo I, invece, gli esoni 4 e 5 appartengono al gene RhcE. Cartron J.P. et al. (23) hanno descritto uno scambio tra gli esoni 2 e 3, rispettivamente nei fenotipi DIIIb e DIIIc. Nel fenotipo DIVa, i segmenti trasferiti non risulterebbero contigui, ma interesserebbero gli esoni 3 e 7 (parziale conversione dell'esone).

Alcune varianti, come il DVII, sono invece originate da mutazioni puntiformi del gene RHD (presenza di una mutazione nell'esone 2 che sostituisce la leucina con una prolina in posizione 110).

2.3.2 D debole

L'antigene D debole (D weak) in passato era nominato Du. Presenta un'alterazione quantitativa e non qualitativa dell'antigene. In questo fenotipo l'antigene D è presente sulla membrana eritrocitaria con un numero di siti antigenici ridotto da un quinto ad un decimo rispetto ai fenotipi D positivi.

E' stato dimostrato che, in alcuni casi, la sequenza RHD è normale, ma vi è un'importante riduzione del mRNA del gene (24), mentre in altri casi insorgono mutazioni puntiformi del gene (25).

Tra gli antigeni D deboli ricordiamo anche quelli definiti D deboli epistatici. L'espressione del D si riduce perché depressa da RHCE o RHCE in posizione trans, come evidenziato da Ceppellini R. et al. (26). In questo antigene D non ci sono alterazioni né nella sequenza genetica, né in quella peptidica.

Wagner F.F. et al. (25) definirono 16 tipi di D weak (tabella 2). Essi presentano mutazioni in cui c'è uno scambio di un solo nucleotide, ed il cambio aminoacidico riguarda il segmento transmembranario o intracellulare.

Tabella 2: Mutazioni presenti nei fenotipi D-Weak

<i>Weak - D</i>	<i>Scambio Nucleotidico</i>	<i>Nucleotide</i>	<i>Sostituzione Amminoacidica</i>	<i>Posizione su membrana</i>
Tipo 1	T → G	809	Val ⇔ Gly	TM
Tipo 2	G → C	1154	Gly ⇔ Ala	TM
Tipo 3	C → G	8	Ser ⇔ Cys	IC
	C → G	602	Thr ⇔ Arg	IC
Tipo 4	T → G	667	Phe ⇔ Val	TM
	G → A	819	—	—
Tipo 5	C → A	446	Ala ⇔ Asp	TM
Tipo 6	G → A	29	Arg ⇔ Gln	IC
Tipo 7	G → A	1016	Gly ⇔ Glu	TM
Tipo 8	G → A	919	Gly ⇔ Arg	IC
Tipo 9	G → C	880	Ala ⇔ Pro	TM
Tipo 10	T → C	1177	Trp ⇔ Arg	IC
Tipo 11	G → T	885	Met ⇔ Ile	TM
Tipo 12	G → A	830	Gly ⇔ Glu	TM
Tipo 13	G → C	826	Ala ⇔ Pro	TM
	T → A	544	Ser ⇔ Thr	TM
Tipo 14	A → T	594	Lys ⇔ Asn	IC
	C → G	602	Thr ⇔ Arg	IC
Tipo 15	G → A	845	Gly ⇔ Asp	TM
Tipo 16	T → C	658	Trp ⇔ Arg	TM

2.3.3 Rh null

Esistono aplotipi RH che contengono la totale assenza degli antigeni di tale sistema. Ne è un esempio il fenotipo Rhnull. Alla base di questo ci sono 2 meccanismi genetici, uno dovuto all'azione di un gene regolatore-soppressore (27) (RhAG) diverso dal locus RH, ed un secondo dovuto all'azione di un gene amorfo (28), situato proprio sul locus RH.

Il gene RHAG mutato rappresenta l'ipotetico gene soppressore che impedisce il trasporto e/o la sistemazione del complesso Rh sulla membrana dei globuli rossi e ostacola quindi l'espressione fenotipica Rh, mentre il gene RHAG normale corrisponderebbe al normale gene regolatore (15). Sono stati individuati due tipi di Rhnull di tipo regolatore (27) (28). In un caso, la regione C-terminale della proteina RhAG è cruciale per assemblare o trasportare il complesso Rh; se subentrano carenze o modifiche, il polipeptide non si esprime o si deforma tanto da non essere riconosciuto dagli anticorpi specifici. Nell'altro caso, la sostituzione di una guanina con una adenina alla prima base dell'introne 1 del gene RHAG da origine ad una bassa attività di trascrizione, oppure alla produzione di un mRNA instabile. Non è stata riscontrata infatti la produzione di un mRNA maturo.

Per quanto riguarda invece l'Rhnull di tipo amorfo, esso avrebbe origine, in alcuni casi, da una larga delezione al locus RH, o in altri casi, da mutazioni o delezioni nell'unico gene RHCE presenti in soggetti D negativi (28). In un caso, la mutazione aveva determinato un codone di stop prematuro nel gene RHCE, mentre nell'altro la mutazione comportava un peptide più corto e diverso dal normale.

Un fenotipo molto simile, anche se non identico a quello Rhnull, fu descritto da Crown B. et al. (29), in una donna canadese, i cui antigeni Rh erano tutti marcatamente depressi. A tale fenotipo fu dato il nome di Rhmod (modified). Questo fenotipo, in analogia con il fenotipo Rhnull regolatore,

appare controllato da un gene soppressore. Forse il fenotipo riflette o l'incompleta penetranza delle mutazioni del gene RHAG oppure altre mutazioni sconosciute. Mancano studi approfonditi di biologia molecolare su campioni di questo fenotipo. Comunque, in uno studio condotto su un soggetto Rhmod che presentava tracce degli antigeni Rh ed un basso di

livello di proteine RhAG utilizzando la citometria a flusso ed il Western Blot, Chérif-Zahar B. et al. (30) hanno potuto evidenziare che il polipeptide Rh era normale, mentre la proteina RhAG è risultata alterata per un singolo scambio di aminoacidi.

La condizione Rnull è associata ad un difetto della membrana eritrocitaria, derivante dall'assenza o dalle modifiche delle proteine Rh, necessarie per l'integrità della membrana stessa. Ciò comporta una ridotta sopravvivenza delle emazie in circolo che causa un'anemia emolitica, denominata Rnull disease (31), occasionalmente grave, ma molto spesso, di modesta entità.

3. SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo del mio lavoro di tesi è stato quello di evidenziare la tipologia e la frequenza delle varianti dell'antigene RhD in pazienti e donatori afferenti al DAI di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale dell'AOU "Federico II", al fine di prevenire alloimmunizzazioni in seguito a trasfusioni e/o gravidanze.

Gli standard AABB per le Banche del Sangue ed i Servizi Trasfusionali (32) richiedono che i campioni di sangue dei donatori siano esaminati per le varianti antigeniche dell'antigene D (D variant) e siano etichettati come RhD positivi, poiché la trasfusione di sangue con un donatore D variant in un ricevente RhD negativo può evocare una risposta immunitaria contro l'antigene RhD. In quest'ottica è importante che gli individui D variant siano etichettati come donatori RhD positivi. La trasfusione di un donatore D variant in un ricevente RhD negativo non va effettuata.

La trasfusione dei riceventi, i cui eritrociti sono stati tipizzati come D variant, è spunto di discussione. La maggior parte di questi pazienti può, quasi sempre, ricevere del sangue RhD positivo senza rischiare l'alloimmunizzazione. Tuttavia esiste anche la possibilità che, l'assenza di uno o più epitopi in alcune varianti dell'antigene D possono determinare la produzione di alloanticorpi anti-D con una trasfusione di sangue RhD positivo.

In questo caso gli standard AABB per le Banche del Sangue ed i Servizi Trasfusionali (32) richiedono solo che i campioni dei pazienti siano esaminati con l'agglutinazione diretta con il siero anti-D. Il test del Du non è richiesto. Infatti i pazienti classificati come D variant possono essere trasfusi con donatori RhD negativi senza alcun problema.

Tuttavia alcuni immunoematologi ritengono che questa pratica sia eccessivamente dispendiosa per le scorte di sangue D negativo, e preferiscono quindi, individuare i riceventi D variant per assegnare del sangue RhD positivo, quando possibile.

In questo lavoro di tesi è stato effettuato il test del Du su tutti gli individui risultanti RhD negativi con i 2 antisieri anti-D o su quelli che presentavano una discrepanza di risultato con i suddetti antisieri. Tale procedura è stata scelta sia per valutare la frequenza delle varianti dell'antigene RhD nella popolazione afferente al DAI, sia per evitare sprechi di sangue di sacche di donatori RhD negative.

Nella tabella 3 sono indicate le linee guida per la trasfusione e la somministrazione di immunoprofilassi in pazienti D variant.

Tabella 3: Gestione raccomandata per la trasfusione e la somministrazione di immunoglobuline in pazienti con fenotipo D weak e D partial

Fenotipo D-weak e D-partial	Trasfusione di globuli rossi	Somministrazione di immunoprofilassi
D weak tipo 1	D positivo	No
D weak tipo 2	D positivo	No
D weak tipo 4	D positivo	No
D weak tipo 4.2	D negativo	Si
D weak tipo 15	D negativo	Si
DEL	D negativo	Si
DAU	D negativo	Si
DNB	D negativo	Si
DHMi	D negativo	Si
DVII	D negativo	Si
R0^{Har}	D negativo	Si

4. MATERIALI E METODI

Presso il DAI di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale dell'AOU "Federico II" viene effettuata routinariamente la ricerca delle varianti dell'antigene RhD su campioni di sangue di pazienti e donatori per i quali, in corso di tipizzazione eritrocitaria per l'antigene D, si sia riscontrata una delle seguenti condizioni:

1. Discrepanze nella determinazione dell'antigene RhD con diversi reagenti anti-D (antisiero monoclonale IgG-IgM Mix e antisiero monoclonale IgM)
2. Positività del test dell'antiglobulina indiretto (Du positivo)
3. Presenza di anticorpi anti-D in soggetti RhD positivi

Dal Novembre 2014 a Febbraio 2016 abbiamo valutato la presenza e/o assenza dell'antigene D su campioni di sangue di 14722 donatori e 33524 pazienti. Tutti i campioni in EDTA sono stati sottoposti all'identificazione dell'antigene RhD con due diversi antisieri monoclonali utilizzando strumentazioni completamente automatizzate delle ditte IMMUCOR e ORTHO (GALILEO e AUTOVUE).

Dei 48246 campioni, 4169 risultavano negativi per l'antigene D o presentavano un'incongruenza tra le determinazioni ottenute con i due diversi antisieri. Su questi 4169 campioni, successivamente è stato effettuato il test dell'antiglobulina per il Du, che in 56 casi è risultato positivo con diversa reattività. Inoltre tutti i campioni esaminati presentavano il test di Coombs diretto ed indiretto negativo.

L'esistenza di varianti qualitative e quantitative dell'antigene RhD ne rende talvolta difficile la tipizzazione con importanti conseguenze in ambito immuno-trasfusionale e nella prevenzione dell'alloimmunizzazione materno-

fetale. Questo è il motivo per cui è stata effettuata la ricerca delle varianti dell'antigene RhD nei 56 campioni.

I campioni sottoposti allo studio delle varianti dell'antigene RhD sono stati indagati in prima istanza tramite l'agglutinazione in gel su microcolonna ed in un secondo momento con la tecnica dell'amplificazione genica mediante la Polymerase Chain Reaction (PCR).

Negli ultimi anni, infatti, l'avvento delle metodiche di biologia molecolare per lo studio diretto dei geni e delle loro anomalie, sta offrendo la possibilità di precisare meglio i rapporti esistenti tra il fenotipo eritrocitario ed il rispettivo genotipo.

4.1 Test di Coombs

Il test di Coombs (Figura 3), chiamato anche test dell'antiglobulina, è utilizzato per rilevare la presenza di:

- anticorpi legati ad antigeni della membrana dei globuli rossi (TCD);
- anticorpi liberi nel siero che possono reagire con antigeni eritrocitari (TCI).

Il principio che questo test utilizza è l'emoagglutinazione. I globuli rossi, pur essendo presenti nel sangue in quantità elevatissime, non vengono mai a contatto tra loro perché sulle membrane sono presenti cariche elettriche negative che determinano una continua repulsione. Per far sì che i globuli rossi sensibilizzati agglutinino, è necessario che tra essi si creino dei ponti abbastanza lunghi tali da poter vincere la forza di repulsione delle cariche negative: questi ponti sono gli anticorpi (IgG e IgM).

Il siero di Coombs è un AHG (Anti-Human Globulin) in grado di rilevare sia le IgG che il C3d eventualmente presenti sulla superficie dei globuli rossi. L'anti-IgG si lega principalmente alla porzione Fc delle molecole dell'anticorpo sensibilizzante. I due siti Fab della molecola di AHG formano un ponte tra cellule adiacenti rivestite di anticorpi per produrre un'agglutinazione visibile. Le cellule che non hanno globuline adese non saranno agglutinate.

La diluizione degli eritrociti, necessaria per eseguire il test, viene effettuata in un mezzo a bassa forza ionica (LISS) che riduce la distanza tra gli eritrociti e facilita la reazione di agglutinazione.

Il test diretto si esegue per evidenziare gli anticorpi incompleti legati alle emazie del soggetto, presenti in patologie quali la malattia emolitica del neonato (MEN), anemia emolitica autoimmune (MEA), reazioni trasfusionali, sensibilizzazione ai farmaci. Esso consiste nel mettere a contatto gli eritrociti del paziente con il siero di Coombs. L'agglutinazione delle emazie indica la presenza di Ab adesi ai globuli rossi (test positivo).

Il test indiretto, invece, è eseguito per la determinazione degli auto/alloanticorpi circolanti. La metodica prevede la sensibilizzazione di globuli rossi (emazie test) con il siero del paziente e successivo utilizzo del siero di Coombs. Se nel siero del paziente sono presenti Ab liberi, questi legheranno le emazie test ed il siero di Coombs permetterà la visualizzazione dell'agglutinazione.

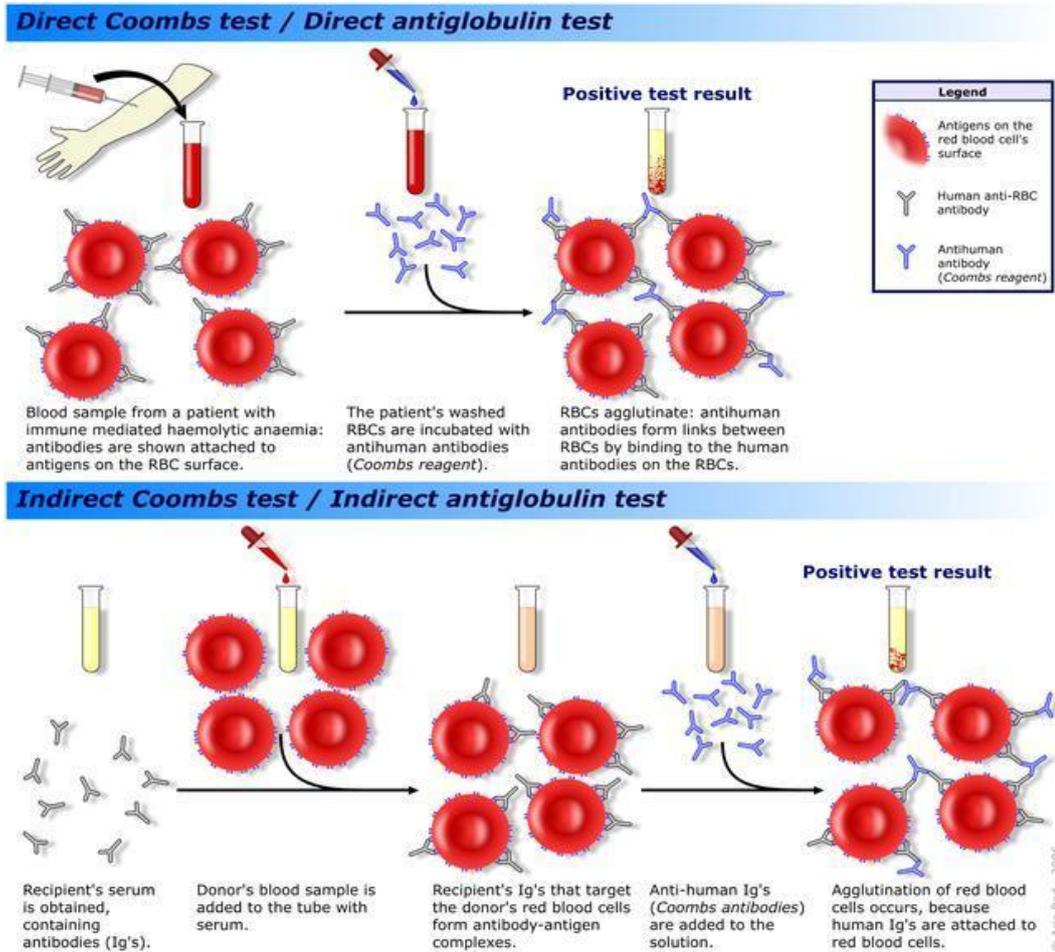


Figura 3: Test di Coombs diretto ed indiretto

4.2 Agglutinazione in gel su micro colonna

Questa metodica prevede che i globuli rossi vengono filtrati attraverso una colonna con una matrice in gel, costituita da resina e siero di Coombs, che separa selettivamente le popolazioni eritrocitarie. I preparati commerciali consistono in sistemi che impiegano una schedina di microcolonne al posto delle provette convenzionali. Al vertice di ogni colonna c'è una camera di reazione nella quale vengono introdotti i globuli rossi da soli o insieme al siero (o plasma) con cui verranno incubati. Utilizzando la centrifugazione

a 910 rpm (85 G) per 10 minuti permettiamo alle cellule di passare attraverso la colonna. Il mezzo nella colonna separa le emazie agglutinate da quelle non agglutinate sulla base della dimensione degli aggregati. Le microcolonne si trovano su schedine presenti nel kit di reazione. Utilizzando questa tecnica si elimina la necessità di lavare in soluzione salina.

Quando non agglutinate, le emazie precipitano sul fondo della colonna, mentre le emazie agglutinate vengono trattenute in alto o lungo il corpo della colonna.

In questo studio è stato utilizzato il kit “ID-Partial RhD-Typing” della ditta BIO-RAD, formato da:

1. 6 antisieri anti-D monoclonali specifici con aggiunta di albumina bovina, che consentono di differenziare le seguenti categorie: II, IV, V, VI, VII, DFR, DBT, RoHar.
2. Schedina “ID-Partial RhD-Typing” con 6 microcolonne contenenti reagenti polispecifici antiglobulina umana (anti-IgG di coniglio e anti-C3d monoclonale) nella matrice del gel.

La metodica si basa su 4 fasi (Figura 4):

- I fase: preparare il campione del paziente in una sospensione di eritrociti allo 0,8% mediante un diluente a bassa forza ionica (diluente LISS);
- II fase: pipettare 50 μ L della sospensione di eritrociti allo 0,8% in ognuna delle 6 microcolonne della schedina. Pipettare 25 μ L di ciascuna anticorpo monoclonale anti-D nelle rispettive microcolonne dove già sono state pipettate le sospensioni di eritrociti;
- III fase: incubare la schedina a 37 °C per 15 minuti;
- IV fase: centrifugare la schedina a 910 rpm (85 G) per 10 minuti.

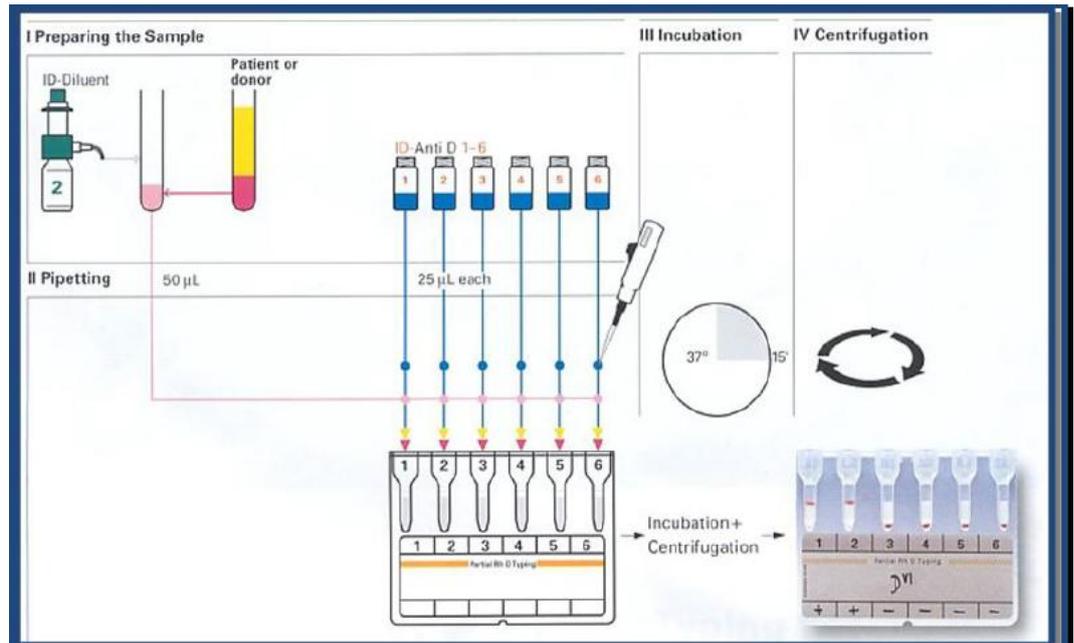


Figura 4: Si introducono in ogni camera delle colonne 50 μL di una sospensione allo 0,8% di eritrociti (in tampone LISS) del paziente e 25 μL di ciascun anticorpo monoclonale anti-D. Si incuba la scheda a 37°C per 15 minuti e dopo si centrifuga a 910 rpm (85 G) per 10 minuti.

Per ottenere risultati più attendibili, è consigliato eseguire la determinazione su un campione in presenza di citrato o EDTA. Si possono usare anche campioni prelevati in provette senza anticoagulanti. L'identificazione della variante viene effettuata confrontando la reattività del campione in esame con una griglia di valori attesi (Figura 4).



ID-Partial D Typing Set



Interpretationstabelle / Interpretation table / Tableau d'interprétation

Tabella di interpretazione / Tabla de interpretación / Tabela de interpretação

Zelllinie Cell line Lignée cellulaire Linea cellulari Linea celular Clones	Anti-D	D II	D III	D IVa	D IVb	D V	D VI	D VII	DFR	DBT	DHAR	Reaktionen Reactions Reactions Reazioni Reacciones Reações
LHM76/55 (IgG)	1	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	
LHM77/64 (IgG)	2	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	
LHM70/45 (IgG)	3	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	
LHM59/19 (IgG)	4	+	+	+	+	+	-	+/-*	-	+	-	
LHM169/80 (IgG)	5	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	
LDM1 (IgM)	6	+	+	+	+	+/-	-	+	-	+	+/-	

* Deutsch: Eine schwächere Reaktion kann mit diesem Antikörper, im Vergleich mit den anderen 5 Seren, beobachtet werden.

* English: A weaker reaction can be observed with this antibody, in comparison with the other 5 sera.

* Français: On peut observer une réaction plus faible avec cet anticorps, en comparaison les 5 autres sérums.

* Italiano: Una reazione più debole può essere osservata con questo antisiero, rispetto agli altri 5 sieri.

* Español: Se puede observar una reacción más débil con este anticuerpo, en comparación con los otros 5 sueros.

* Português: Uma reação mais fraca pode ser observada com este anticorpo, em comparação com os outros 5 soros.

Name / Name / Nom / Nome / Nombre / Nome	Blutgruppe + Antigene / Bloodgroup + anti-gens / Groupe sanguin + antigènes / Gruppo sanguigno + antigeni / Grupo sanguíneo + antígenos / Grupo de sanguíneo + antígenos	Interpretation / Interpretation / Interprétation / Interpretazione / Interpretación / Interpretação	Datum / Date / Date / Data / Fecha / Data

8001452 10.10

Figura 5: Master List

4.3 PCR-SSP

In collaborazione con l'Ospedale San Camillo di Roma, è stata effettuata la ricerca delle varianti dell'antigene RhD su campioni di DNA utilizzando la metodologia PCR-SSP (Essemedical).

La denominazione SSP sta per Sequence Specific Priming e si riferisce ad una particolare tecnica di PCR nella quale solo la sequenza del primer con la terminazione 3' è interessata alla specificazione dell'allele che deve essere identificato. Il DNA dei campioni è stato estratto dai linfociti, mediante la metodica del Salting Out.

Il Salting Out prevede l'utilizzo di sangue intero in EDTA ed i seguenti passaggi:

1. Lisi dei globuli rossi (è importante in questo passaggio la completa lisi dei globuli rossi poiché il ferro contenuto nell'emoglobina inibisce l'enzima di amplificazione Taq);
2. Lisi dei globuli bianchi;
3. Degradazione delle proteine tramite aggiunta di una soluzione di Na perclorato (400 µL);
4. Osservazione dei filamenti di DNA con l'utilizzo di isopropanolo assoluto freddo e lavaggio con una soluzione di etanolo al 70%;
5. Allontanamento di ogni traccia di etanolo e idratazione del DNA aggiungendo 100-200 µL di acqua distillata sterile;
6. Incubazione dell'estratto a 56 gradi per 30 minuti in agitazione, con successiva conservazione per anni a -20°C.

La concentrazione del DNA si ottiene mediante lettura allo spettrofotometro con densità ottica di 260 nm. La purezza, invece è valutata con 2 letture allo spettrofotometro a 260 e 280 nm. Il loro rapporto deve essere compreso tra 1,5 e 1,8. La metodica PCR-SSP, con l'ausilio dei protocolli operativi acclusi al kit, consente l'amplificazione di definite sequenze del suddetto DNA. Essa si basa sul principio che, per l'amplificazione di una sequenza di DNA bersaglio con la Taq Polimerasi ricombinante, oligonucleotidi primer complementari sono più efficienti rispetto ad oligonucleotidi primer non complementari. Le coppie di primer sono state studiate in modo da essere perfettamente complementari solo con l'allele o con un gruppo di alleli. In condizioni di PCR rigidamente controllate, tali coppie di primer consentono l'amplificazione di sequenze specifiche (risultati positivi), mentre coppie di primer non complementari non consentono alcuna amplificazione (risultato negativo).

Dopo la fase di PCR, i frammenti di DNA amplificati sono stati separati tramite elettroforesi su gel di agarosio e sono stati visualizzati tramite colorazione con bromuro di etidio ed esposizione alla luce ultravioletta.

L'interpretazione dei risultati dell'analisi PCR-SSP si basa sulla presenza o assenza di uno specifico frammento di DNA amplificato. Poiché l'amplificazione, durante la reazione della PCR, può essere influenzata sfavorevolmente da vari fattori, per ogni reazione di PCR viene inclusa una coppia di primer di controllo interno. Se dopo la PCR non è visibile alcun prodotto, il controllo interno dovrà essere ben visibile a dimostrazione dell'efficacia dell'amplificazione.

5. RISULTATI

Sono stati analizzati 48246 campioni, di cui 4169 sono risultati negativi per l'antigene D. Su di essi è stato effettuato il test del Du, che in 56 casi è risultato positivo. Tutti i campioni presentavano, inoltre il test del Coombs diretto (TCD) ed indiretto (TCI) negativo.

I 56 campioni risultati positivi al test del Du sono stati ulteriormente analizzati mediante la metodica SSP-PCR per individuarne le varianti RhD. Nella tabella sono messi in parallelo i risultati sierologici e molecolari dei 56 campioni risultanti positivi al test del Du. I risultati sierologici sono stati ottenuti con il test di agglutinazione in gel su microcolonna. I risultati molecolari, invece, con la tecnica SSP-PCR (Tabella 4).

Tabella 4: Risultati sierologici e molecolari dei 56 campioni risultanti positivi al test del Du.

CAMPIONE	FENOTIPO	SIEROLOGIA	MOLECOLARE
1	B ccee	DV	D weak 4.2 – ccee
2	0 ccEe	DFR	D weak 5 – ccEe
3	B CCee	D weak	D – CCee
4	0 ccEe	DFR	D weak 15 – ccEe
5	0 CCee	D weak (?)	D weak 1 – CCee
6	A Ccee	D weak (?)	D weak 1 – Ccee
7	A Ccee	D weak	D weak 1 – Ccee
8	A Ccee	D weak	D weak 1 – Ccee
9	A CcEe	D weak	D weak 1 – CcEe
10	A Ccee	DIII	D weak 1 – Ccee
11	B CCee	D weak	D weak 1 – CCee
12	O Ccee	D weak	D weak 1 – Ccee
13	B Ccee	D weak	D weak 1 – Ccee
14	B Ccee	D weak	D weak 1 – Ccee
15	A Ccee	D weak	D weak 1 – Ccee
16	A Ccee	D weak	D weak 1 – Ccee
CAMPION	MOLECOL	SIEROLOGIA	FENOTIPO
17	B CCee	D weak	D weak 1 – CCee
18	0 Ccee	D weak	D weak 3 – CCee

19	A Ccee	D weak	D weak 1 – Ccee
20	A Ccee	D weak	D weak 1 – Ccee
21	0 CCee	D weak	D weak 3 – CCee
22	A Ccee	D weak	D weak 1 – Ccee
23	A Ccee	DIII, DVII, D weak (?)	D weak 1 – Ccee
24	B Ccee	DIII (?)	D weak 3 – Ccee
25	0 Ccee	D weak	D – Ccee
26	0 ccEe	DV	D weak 5 – ccEe
27	0 ccEe	DFR	D weak 5 – ccEe
28	0 ccEe	DFR	D weak 5 – ccEe
29	A Ccee	DFR	D weak 4.2 – Ccee
30	0 Ccee	D weak	D weak 1 – Ccee
31	A Ccee	D weak	D weak 1 – Ccee
32	0 Ccee	D weak	D weak 1 – Ccee
33	0 Ccee	D (?)	D – Ccee
34	A Ccee	D weak	D – Ccee
35	0 CcEe	D weak	D – CcEe
36	A Ccee	D weak	D weak 1 – Ccee
37	0 Ccee	D weak	D – Ccee
38	A Ccee	DV	D weak 1 – Ccee
39	0 Ccee	DIII	D weak 1 – Ccee
40	0 ccEe	DV	D weak 5 – ccEe
41	A Ccee	D weak	D weak 1 – Ccee
42	AB Ccee	D weak	D – Ccee
43	A Ccee	D weak	D weak 1 – Ccee
44	0 CcEe	DFR	D weak 2 - CcEe
45	B Ccee	D weak	DFR - Ccee
46	0 Ccee	DFR	DFR - Ccee
47	A Ccee	DFR	DFR - Ccee
48	0 Ccee	DFR	DFR - Ccee
49	0 Ccee	DVI	DVI tipo 4 - Ccee
50	0 Ccee	DVI	DVI tipo 4 - Ccee
51	A ccEe	DIII	D - ccEe
52	0 Ccee	D weak	D - Ccee
53	A Ccee	D weak	D - Ccee
54	A Ccee	D weak	D - Ccee
55	A Ccee	D weak	D - Ccee
56	A CCee	D weak	D - CCee

Dei 56 campioni positivi al test del Du, analizzati sierologicamente, sono risultati:

- 35 D weak, di cui 2 non ben specificati;
- 4 DV;
- 9 DFR;
- 4 DIII di cui 1 non ben specificato;
- 1 D, ma è stato di difficile interpretazione;
- 2 DVI;
- 1 test è risultato di dubbia interpretazione, risolta soltanto con il test molecolare;

Degli stessi campioni analizzati con il test molecolare sono risultati:

- 25 D weak tipo 1;
- 1 D weak tipo 2;
- 3 D weak tipo 3;
- 5 D weak tipo 5;
- 1 D weak tipo 15;
- 13 D;
- 4 DFR;
- 2 DVI tipo 4.

6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Negli ultimi dieci anni sono stati fatti considerevoli progressi nella comprensione delle basi molecolari che regolano l'espressione degli antigeni del sistema Rh, anche se resta ancora da chiarire il modello definitivo della struttura a mosaico dell'antigene RhD, così come ancora poco si conosce circa la loro funzione negli eritrociti.

In passato la sola agglutinazione in fase liquida ed una minore qualità degli antisieri utilizzati ha portato spesso alla mancata identificazione delle varianti dell'antigene RhD e quindi ad una sottostima della loro reale frequenza nella popolazione e ad una sottovalutazione della loro importanza in medicina trasfusionale.

Attualmente disponiamo di strumenti e metodiche che ci consentono di semplificare l'iter per giungere alla corretta identificazione delle varianti dell'antigene RhD.

La corretta tipizzazione dell'antigene RhD permette quindi di prevenire alloimmunizzazioni in seguito a trasfusioni e/o gravidanze.

Per quanto concerne la gravidanza, il feto può essere un D variant, e, nel caso in cui la madre sia un individuo RhD negativo, può indurre una risposta immunitaria con formazione di Ab anti-D e possibile MEN. Analogamente è possibile una alloimmunizzazione materno fetale in caso di feto RhD positivo e madre di fenotipo RhD variant.

Nella pratica trasfusionale bisogna distinguere se il soggetto RhD variant sia un donatore oppure un ricevente.

Gli Standard AABB per le Banche del Sangue dei donatori individuati come varianti RhD prevedono che siano etichettati come RhD positivi. Un

donatore D variant infatti può indurre alloimmunizzazione in un individuo ricevente RhD negativo.

Oggi i sieri anti-D a disposizione, rispetto al passato, sono in grado di riconoscere buona parte degli individui D weak, anche se alcuni pazienti possono ancora sfuggire, ma possono essere individuati con i test molecolari. Nei dati riportati in questa tesi, la maggior parte dei campioni analizzati mostrava una discrepanza nel risultato dei 2 antisieri anti-D. In qualche caso inoltre i due antisieri erano entrambi negativi ma comunque tutti i campioni studiati presentavano un test del Du positivo. Tutti i campioni sono stati analizzati utilizzando il test specifico sierologico (ID-Partial RhD Typing) e molecolare (SSP-PCR). Da ciò si evidenzia l'importanza di andare ad individuare i soggetti D variant nei donatori.

Invece per i riceventi D variant ci sono pareri discordanti. Se è vero da un lato che gli Standard AABB prevedono soltanto il test con i 2 antisieri anti-D e nessuna ricerca dell'antigene D variant, e di trattare i riceventi D variant con sangue RhD negativo, dall'altro gli immunoematologi ritengono questa pratica eccessivamente dispendiosa per le scorte di sangue RhD negativo. Siccome i D variant, soprattutto i D weak, dove possibile, possono essere trattati con sangue RhD positivo, ecco che assume notevole importanza l'individuazione e l'ulteriore tipizzazione sierologica e molecolare dell'antigene RhD in modo da capire, nel caso fossero pazienti, quale sia la migliore terapia trasfusionale salvaguardandoli da alloimmunizzazione se trattati con sangue RhD positivo. Buona parte dei D weak possono ricevere sangue RhD positivo (secondo i dati riportati in letteratura che non segnalano alloimmunizzazioni). Gli individui D variant, mancanti di alcuni epitopi, sono soggetti ad alloimmunizzazione se trattati con sangue RhD positivo. Ciò è particolarmente vero per i soggetti DVI, di cui ho individuato 2 soggetti di tipo 4 nel corso del mio studio di tesi. Di essi la prima era una ricevente gravida trasfusa dopo il parto con

sangue RhD negativo alla quale è stata somministrata immunoprofilassi perché il neonato era RhD positivo, secondo le linee guida esposte nella tabella 3, l'altro paziente era un neonato con madre RhD negativo e soggetta a possibile immunizzazione. Alla madre è stata quindi effettuata immunoprofilassi post partum.

Dai risultati presentati si evince che ho individuato molti D weak sia tra i donatori che tra i pazienti. Nel caso in cui essi fossero dei donatori, sono stati tutti etichettati come soggetti RhD positivi. Dei 25 D weak tipo 1, 8 erano pazienti e sono stati trasfusi con RhD positivo. Invece ho individuato solo 1 caso di D weak tipo 2. Anch'egli era un paziente ed è stato trasfuso con RhD positivo.

Caso diverso per i 2 D weak tipo 4.2. Di essi, 1 era un donatore e quindi etichettato come soggetto RhD positivo, l'altro era un paziente e quindi trasfuso con sangue RhD negativo, secondo le linee guida (tabella 3).

Tutto ciò mette in evidenza che la tipizzazione dei soggetti D variant permette di trattare alcuni di essi con sangue RhD positivo, senza rischio di allomunizzazione e con risparmio delle scorte di sangue RhD negativo, fenotipo meno frequente nella popolazione e quindi meno presente nelle emoteche.

Dai dati da me ottenuti è emerso un altro aspetto molto interessante: la discrepanza esistente tra i risultati dei test sierologici e quelli molecolari. Molti individui etichettati come D partial dalla sierologia sono invece risultati D weak dal test molecolare. Inoltre alcuni risultati del test sierologico (4 in particolare) sono stati di difficile e dubbia interpretazione, e soltanto il test molecolare è stato in grado di dare la corretta tipizzazione. Ciò, per fortuna, non ha determinato problemi per la terapia trasfusionale, in quanto i 4 individui erano donatori e sarebbero stati comunque etichettati come RhD positivi. Se fossero però stati dei pazienti,

nel dubbio, si sarebbero trattati con sangue RhD negativo, per evitare possibili alloimmunizzazioni, nel caso in cui ci fosse stata esigenza immediata di trasfusione. Qualora non ci fosse stata una esigenza immediata di trasfusione, sarebbe stato meglio aspettare i risultati più sicuri ottenuti con la metodica molecolare.

Un'altra delle discrepanze è che alcuni individui etichettati come D weak dai test sierologici, sono risultati invece RhD positivi con il test molecolare. Si ipotizza in questo caso un possibile effetto Ceppellini e sarebbe interessante approfondire e sviluppare ulteriormente questo studio.

I risultati presentati hanno messo in evidenza che il test sierologico ha dei limiti. E' stato appurato anche con altri studi come il problema non riguarda soltanto il kit prodotto dalla BioRad che è stato utilizzato in questo studio, ma sia un problema generale del test sierologico, in quanto anche con kit di altre ditte utilizzati in altri SIT sono state riscontrate delle discrepanze. Il motivo delle discrepanze è di difficile interpretazione, in quanto non ci è concesso sapere la formule dei reagenti, ma è possibile sospettare un problema di specificità degli antisieri nei confronti dei diversi epitopi dell'antigene RhD.

Il test molecolare è sicuramente più affidabile e preciso del test sierologico, ma anche più costoso. Inoltre l'esecuzione del test richiede personale altamente qualificato. Purtroppo utilizzarlo come indagine di routine non è sempre possibile, a causa dei suoi tempi di esecuzione che non sempre coincidono con la rapida esigenza trasfusionale. Il test sierologico, invece, ha tempi compatibili con essa, specialmente nei casi in cui la trasfusione è urgente. Ecco perché, al momento, a causa proprio dei limiti dei test sierologici, diventa importante, dove i tempi lo permettano, l'indagine molecolare della variante dell'antigene RhD.

Lo studio molecolare quindi è qualcosa che al momento è utilizzato come supporto e comparazione della tipizzazione sierologica, e risulta di grande utilità in diverse situazioni:

1. Comparazione ed eventuale rettifica dei risultati ottenuti con le tecniche basate sulla sierologia;
2. Ricerca dei sottotipi delle varianti dell'antigene RhD;
3. Identificazione di particolari varianti D weak per cui si ipotizza una possibile alloimmunizzazione dopo trasfusione con sangue RhD positivo (ad esempio D tipo 4.2);
4. Fornire risposte in casi dubbi od indeterminati;
5. Analizzare gli individui in cui è impossibile effettuare i test sierologici (nel caso in cui il TCD sia positivo).

In conclusione, la tecnica molecolare permette di risolvere i limiti della sierologia, che però resta la metodica principale di riferimento per i motivi esposti in precedenza. E' sicuramente auspicabile la disponibilità al più presto di test sierologici più affidabili e precisi che non presentino più i limiti attuali e che ci permettano di non dover per forza utilizzare i test molecolari che attualmente sono indispensabili per una corretta caratterizzazione degli individui RhD variant.

7. BIBLIOGRAFIA

1. **AABB.** Technical Manual 15th edition, (2009);
2. **Levine P. and Stetson R.E.** An unusual case of intragroup agglutination. *J.A.M.A.*, 113,126, (1939);
3. **Landsteiner K., Wiener A.S.** An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for rhesus blood. *Proc Soc Exp Biol Med* 1940; 43:223;
4. **Levine P., Celano M.J., Fenichel R., Pollack W. And Singher H.A.** "D-like" antigen in rhesus monkey, human Rh positive and human Rh negative red blood cells. *J. Immunol.*, 87,747, (1961);
5. **Wiener A.S.** Genetic theory of the Rh blood types. *Proc Soc Exp BiolMed* 1943;54:316-19;
6. **Fisher R.A., Race R.R.** Rh gene frequencies in Britain. *Nature* 1946;157:48-9;
7. **Tippett P.** A speculative model for the Rh blood groups. *Ann Hum Genet* 1986;50:241-7.
8. **MacGeoch C., Mitchell C.J., Carritt B.** et al. Assignment of the chromosomal locus of the human 30kDa Rh (Rhesus) blood group antigen-related protein (Rh 30) to chromosome region 1p36.13-p34. *Cytogenet Cell Genet*, 59, 261, 1992,
9. **Cartron J-P.** Defining the Rh blood group antigens: biochemistry and molecular genetics. *Blood Rev* 1994;8: 199-212.
10. **Colin Y., Chèrif-Zahar B., Le Van Kim C.** et al. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. *Blood*, 78, 2747, 1991.
11. **Huang C.H.** Molecular insights into the Rh protein family and associated antigens. *Curr Opin Haematol*, 4,94, 1997.
12. **Huang C.H., Liu P.Z., Cheng J.G.** Molecular biology and genetics of the Rh blood group system. *Semin Hematol* 2000;37:150-65.
13. **Lindberg F.P., Lublin D.M., Telen M.J.,** et al. Rh-related antigen CD47 is the signal transducer integrin-associated protein. *J Biol Chem*, 269, 1567, 1994.
14. **Ridgwell K., Spurr N.K., Laguda B.,** et al. Isolation of cDNA clones for a 50 kDa glycoprotein of the human erythrocyte membrane associated with Rh (rhesus) blood-group antigen expression. *Biochem J* 1992;287:223-8.

15. **Chèrif-Zahar B., Matassi G., Raynal V.** et al. Rh-deficiency of the regulator type caused by splicing mutations in the human RH50 gene. *Blood*, 92, 2536, 1998.
16. **Tippett P.** Regulator genes affecting red cell antigens. *Transfus Med Rev* 1990;4:56-68.
17. **Tippett P., Lomas-Francis C., Wallace M.** The Rh antigen D: partial D antigens and associated low incidence antigens. *Vox Sang*, 70, 123, 1996.
18. **Jones J., Scott M.L., Voak D.** Monoclonal anti-D specificity and Rh D structure: criteria for selection of monoclonal anti-D reagents for routine typing of patients and donors. *Transf Med*, 5, 171, 1995.
19. **Lomas C., Tippett P., Thompson K.M.** et al. Demonstration of seven epitopes on the Rh antigens D using human monoclonal anti-D antibodies and red cells from D categories. *Vox Sang*, 57, 261, 1989.
20. **Lomas C., McColl K., Tippett P.** Further complexities of the Rh antigen D disclosed by testing category DII cells with monoclonal anti- D. *Transfus Med* 1993;3: 67-69.
21. **Scott M.L.** RH serology: co-ordinator's report. 4th International Workshop Monoclonal Antibodies against Human Red Cell Surface Antigens. Paris. *Transfus Clin Biol* 2002,9: 23-29.
22. **Avent N.D., Finning K.M., Liu W., Scott M.L.** Molecular biology of partial D phenotypes. *TrasfClinBiol*, 6, 511, 1996.
23. **Cartron J.P., Rouillac C., Le Van Kim C.** et al. Tentative model for the mapping of D epitopes on the Rh D polypeptide. *Trans Clin Biol*, 6,497,1996.
24. **Rouillac C., Gane P., Cartron J.** et al. Molecular basis of the altered antigenic expression of RHD in weak D (Du) and RhC/e in RNphenotypes. *Blood*, 87, 4853, 1996.
25. **Wagner F.F., Gassner C., Müller Th., Schönitzer D., Schunter F., Flegel W.A.** Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood* 1999;93:385-393.
26. **CPELLINI R., DUNN L.C., TURRI M.** An interaction between alleles at the Rh locus in man weakens the reactivity of the Rh0 factor (Du). *Proc. Natl. Acad. Sci: USA*, 41, 283, (1955).
27. **Levine P., Celano M.J., Falkowski F., Chambers J., Hunter O.B. and English C.T.** A second example of ---/--- or Rhnull blood. *Transfusion*, 5, 492, (1965).

28. **Chérif-Zahar B., Matassi G., Raynal V., Gane P.** et al. Molecular defects of the RHCE gene in Rh-deficient individual of the amorph type. *Blood*, 92, 639, (1998).
29. **Chown B., Lewis M., Kaita H., Lowen B.** An unlinked modifier of Rh blood groups: effects when heterozygous and when homozygous. *Am J Hum Genet*, 24, 623, 1972.
30. **Chérif-Zahar B., Raynal V., Gane P.** et al. Candidate gene acting as a suppressor of the RH locus in most cases of Rh deficiency. *Nat Genet*, 12, 168, 1996.
31. **Sturgeon P.** Hematological observations on the anemia associated with blood type Rh null. *Blood*, 36, 310, 1970.
32. **Silva M.A.**, ed. Standards for blood banks and transfusion services 23rd ed. Bethesda, MD: AABB, 2005.