

Introduzione

Sono stati forniti due campioni di globuli rossi che rappresentavano campioni di pazienti emoglobinopatici inviati per la genotipizzazione per facilitare il supporto trasfusionale. I laboratori sono stati invitati ad eseguire la genotipizzazione dei globuli rossi nello stesso modo in cui la eseguono per i campioni clinici, a registrare il metodo usato e a registrare il genotipo e il fenotipo previsto per D, Cc, Ee, MN, Ss, Kk, Fy^a, Fy^b, Fy, Jk^a, Jk^b, Do^a e Do^b.

Percentuale di ritorno / analisi dei dati

L'esercizio è stato distribuito a 55 laboratori, 12 nel Regno Unito e Repubblica d'Irlanda (ROI) e 43 al di fuori del Regno Unito. I risultati sono stati restituiti da 50/55 (90,9%) laboratori entro la data di chiusura.

Risultati test

Tutti, ad eccezione di un laboratorio che ha segnalato emolisi per il paziente 1, hanno riportato una qualità del campione soddisfacente per entrambi i campioni dei pazienti.

Sei laboratori hanno restituito risultati fuori consenso e questi sono evidenziati nella Tabella 1.

Tabella 1 – Risultati fuori consenso

Lab	Patient sample	Reported Genotype	Consensus genotype	Reported predicted phenotype	Consensus predicted phenotype
A	Patient 1	<i>RHD*01</i> (zygosity not determined)	<i>RHD*01N.01/01N.01</i>	D positive	D negative
		<i>RHCE*E/E</i>	<i>RHCE*e/e</i>	E+ e-	E- e+
		<i>GYPA*01/02</i>	<i>GYPA*01/01</i>	M+ N+	M+ N-
		<i>GYPB*04/04</i>	<i>GYPB*03/03</i>	S- s+	S+ s-
		<i>JK*01/01</i>	<i>JK*01/02</i>	Jk(a+b-)	Jk(a+b+)
	Patient 2	<i>RHCE*C/c</i>	<i>RHCE*c/c</i>	C+ c+	C- c+
		<i>RHCE*E/e</i>	<i>RHCE*e/e</i>	E+ e+	E- e+
		<i>GYPA*02/02</i>	<i>GYPA*01/01</i>	M- N+	M+ N-
		<i>KEL*01/02</i>	<i>KEL*02/02</i>	K+ k+	K- k+
		<i>FY*01/01</i>	<i>FY*02/02</i>	Fy(a+b+)	Fy(a-b-)
		GATA mutation not present	Homozygous for GATA mutation		
		<i>JK*01/02</i>	<i>JK*01/01</i>	Jk(a+b+)	Jk(a+b-)
B	Patient 1	<i>RHD*01</i> (zygosity not determined)	<i>RHD*01N.01/01N.01</i>	D negative	D negative
C	Patient 1	<i>RHD*01/01N.01</i>	<i>RHD*01N.01/01N.01</i>	D negative	D negative
D	Patient 1	<i>RHD*01/01N.01</i>	<i>RHD*01N.01/01N.01</i>	D negative	D negative
		<i>KEL*01/02</i>	<i>KEL*02/02</i>	K+ k+	K- k+
	Patient 2	<i>FY*02/02</i>	<i>FY*02/02</i>	Fy(a-b+)	Fy(a-b-)
		GATA mutation not tested	Homozygous for GATA mutation		
E	Patient 2	<i>FY*02/02</i>	<i>FY*02/02</i>	Fy(a-b+)	Fy(a-b-)
		GATA mutation not tested	Homozygous for GATA mutation		
F	Patient 2	<i>DO*01/01</i>	<i>DO*01/02</i>	Do(a+b-)	Do(a+b+)

Il Laboratorio A ha riportato risultati quasi identici ai risultati di consenso per l'esercizio 23RCG4 e potrebbe aver testato i campioni o inserito i risultati di un esercizio precedente.

Tre laboratori (uno nel Regno Unito) hanno indicato di non aver effettuato il test per la mutazione GATA del gene FY (*FY*02N.01*); due di questi hanno riferito che il Paziente 2 esprimerebbe l'antigene Fy^b sui propri globuli rossi, vedere la sezione Discussione per ulteriori informazioni.

I risultati dei laboratori partecipanti e i successivi test condotti per conto di UK NEQAS BTLP dimostrano che il paziente 2 ha diverse varianti alleliche *RH*. In questo caso non è possibile determinare un consenso sul genotipo *RHD* o sul fenotipo D previsto.

RHD

Sedici laboratori hanno riportato la presenza di un allele *RHD* variant, 15/16 laboratori hanno classificato la presenza di *RHD*DAU*, riportata anche come *RHD*10*. Tutte le varianti alleliche *RHD*DAU* sono caratterizzate dalla presenza della mutazione c.1136C>T, p.Thr379Met. *RHD*DAU0* ha solamente questa mutazione e tutti gli epitopi del D sembrano essere espressi. Altri sottotipi *RHD*DAU* portano mutazioni addizionali ad esempio *RHD*DAU3*; c.835G>A, p.Val279Met, che può causare la perdita degli epitopi D e la produzione di anti-D¹.

Il sequenziamento di tutti e 10 gli esoni dei geni *RHD* del Paziente 2 ha trovato le seguenti mutazioni:

- Heterozygous c.835G>A, p.Val279Met
- Homozygous c.1136C>T, p.Thr379Met

Nessuna altra mutazione è stata trovata.

A differenza della maggior parte dei geni, l'ereditarietà di 0, 1 o 2 geni *RHD* è comune. A causa della presenza di una mutazione eterozigote, due alleli *RHD* sono probabilmente presenti. Entrambi gli alleli devono portare la mutazione 1136C>T poiché questo è risultato omozigote, un allele porta anche la variazione c.835G>A. Pertanto, la variante allele 1 porta le mutazioni c.835G>A e c.1136C>T (*DAU3*) e l'allele 2 porta solo c.1136C>T (*DAU0*). Il genotipo previsto è *RHD*DAU3/DAU0*, riportato anche come *RHD*10.03/10.00*. La presenza di due alleli varianti *RHD* è insolita e spesso indicata come eterozigote composto.

RHCE

Il sequenziamento di tutti e dieci gli esoni dei geni *RHCE* del paziente 2 ha rilevato le seguenti mutazioni:

- Omozigote c.48G>C, p.Trp16Cys

Non sono state trovate altre mutazioni. Sono stati rilevati i polimorfismi associati a *RHCE*ce/ce*.

Si presuppone l'ereditarietà di due alleli *RHCE*. In questo caso entrambi portano la variazione c.48G>C e quindi il genotipo previsto è *RHCE*ce.01/ce.01*, indicato anche come *RHCE*01.01/01.01*. Le varianti alleliche *RHD*DAU* vengono spesso ereditate con la variante allelica *RHCE*ce.01* – a supporto dei risultati *RHD* eterozigoti composti.

1. Wagner et al, The DAU allele cluster of the *RHD* gene, BLOOD, JULY 2002; VOL 100, No 1

Discussione

Il laboratorio A potrebbe aver testato i campioni dell'esercizio 23RCG4. È necessario prestare attenzione nel confermare l'identità di tutti i campioni prima dei test. Per i campioni clinici, ciò richiede un controllo completo dei dettagli demografici del paziente per garantire che i risultati siano assegnati al paziente corretto. I campioni VEQ dovrebbero essere soggetti allo stesso processo con un controllo del numero del paziente e del codice dell'esercizio su ciascun campione.

I laboratori B, C e D, presumibilmente commettendo errori di immissione dei dati, hanno registrato genotipi *RHD* errati per il Paziente 1 (*RHD*01N.01/01N.01*), ma hanno registrato il fenotipo D previsto dal consenso (D negativo). Di quelli che hanno risposto alla domanda, 30/50 laboratori (60,0%) (inclusi i laboratori B e D) hanno indicato che i loro risultati sono stati trascritti manualmente su un rapporto cartaceo o trascritti manualmente sul sistema informatico. Quando si immettono i dati per i campioni VEQ è importante verificare che i dati vengano registrati e trascritti rispetto ai pazienti corretti e questo vale anche per l'immissione manuale dei dati o la trascrizione dei risultati di campioni clinici.

FY e mutazione GATA

Il Paziente 2 era omozigote per la mutazione GATA (*FY*02N.01/02N.01*) risultante in un fenotipo previsto dei globuli rossi di Fy(a-b-). I laboratori D ed E hanno indicato di non aver testato la mutazione GATA sia per il paziente 1 che per il paziente 2 e successivamente hanno riportato fenotipi previsti fuori consenso Fy(a-b+) per il paziente 2.

Il test per la mutazione GATA è essenziale per comprendere l'espressione degli antigeni FY sui globuli rossi del paziente. Potrebbe essere che i laboratori D ed E hanno riportato il fenotipo previsto non eritrocitario, ma poiché questo programma si occupa esclusivamente della genotipizzazione dei globuli rossi, i risultati devono essere segnalati in relazione ai globuli rossi.

Incoraggiamo fortemente tutti i laboratori che non eseguono test per la mutazione GATA a rivedere i propri algoritmi di test per garantire che siano utilizzate procedure corrette.

Patient 2 RHD

Dei laboratori che segnalano la presenza di un allele *RHD*DAU*, alcuni test genotipici sembrano rilevare la presenza di c.1136C>T e riportano la presenza di *RHD*DAU* senza definire ulteriormente l'allele preciso. Poiché la mutazione c.1136C>T è omozigote, le piattaforme facendo affidamento sul rilevamento di questo SNP riportano la presenza omozigote degli alleli varianti *RHD*DAU* che portano al fenotipo previsto D+^{var}, trattato come D negativo. Altri test genotipici sembrano rilevare la presenza della mutazione c.835G>A che si trova su *RHD*DAU3*, *RHD*DAU7* e *RHD*DAU11*. Poiché questa mutazione è eterozigote, queste piattaforme sembrano predire la presenza di una variante allelica *RHD* con un allele *wild* di tipo *RHD* e un fenotipo previsto D+.

La crescente disponibilità di piattaforme di genotipizzazione aumenta le informazioni a disposizione dei laboratori trasfusionali, ciò è particolarmente utile nel risolvere casi complessi con anticorpi ma può anche guidare l'assistenza clinica in assenza di alloimmunizzazione. La conoscenza di come il test genotipico aiuti e la corretta applicazione dei risultati è essenziale. Dovrebbero essere messe in atto politiche locali e/o nazionali per governare l'approvvigionamento di sangue per i pazienti D variant. Sebbene si ritenga ampiamente che la trasfusione con globuli rossi D negativi sia la più sicura, ciò deve essere bilanciato con molti altri fattori, quali ad es. la sufficiente disponibilità di sangue D negativo, particolarmente in presenza di altri anticorpi, la probabilità che i pazienti D variant producano anti-D e il significato clinico dell'anti-D se/quando viene prodotto.

Risultati Paziente 1

RISULTATI DI CONSENSO		
GENOTIPO	FENOTIPO PREVISTO	ANTIGENI
<i>RHD*01N.01/01N.01</i>	D negativo	D
<i>RHCE*c/c</i>	C-c+	CcEe
<i>RHCE*e/e</i>	E-e+	CeEe
<i>GYPA*01/01</i>	M+N-	MN
<i>GYPB*03/03</i>	S+s-	Ss
<i>KEL*02/02</i>	K-k+	Kk
<i>FY*01/02</i>	Fy(a+b+)	Fy ^a Fy ^b Fy
<i>GATA mutazione non presente</i>		
<i>JK*01/02</i>	Jk(a+b+)	Jk ^a Jk ^b
<i>DO*02/02</i>	Do(a-b+)	Do ^a Do ^b

Risultati Paziente 2

RISULTATI DI CONSENSO		
GENOTIPO	FENOTIPO PREVISTO	ANTIGENI
N/A	N/A	D
<i>RHCE*c/c</i>	C-c+	CcEe
<i>RHCE*e/e</i>	E-e+	CeEe
<i>GYPA*01/01</i>	M+N-	MN
<i>GYPB*04/04</i>	S-s+	Ss
<i>KEL*02/02</i>	K-k+	Kk
<i>FY*02/02</i>	Fy(a-b-)	Fy ^a Fy ^b Fy
<i>Omozigote per mutazione GATA (Fy*02N.01)</i>		
<i>JK*01/01</i>	Jk(a+b-)	Jk ^a Jk ^b
<i>DO*01/02</i>	Do(a+b+)	Do ^a Do ^b