

Report dell'esercizio pilota EQA 16/17G1 (distribuito il 28 Giugno 2016)

Introduzione

Sono stati forniti due campioni di sangue intero, rappresentanti campioni di pazienti emoglobinopatici, sui cui eseguire la genotipizzazione allo scopo di facilitare il supporto trasfusionale. I laboratori sono stati invitati ad eseguire la genotipizzazione dei globuli rossi nello stesso modo in cui la eseguono per campioni clinici simili, a riportare il metodo utilizzato e il genotipo e il fenotipo previsto per D, Cc, Ee, MN, Ss, Kk, Fya, Fyb, Fy, Jka, Jkb, Doa e Dob. Sono state poste domande supplementari riguardo allo scopo del test e alle modalità di refertazione nella pratica clinica.

Partecipazione

L'esercizio è stato distribuito a 45 laboratori in 22 Paesi diversi. La percentuale di partecipazione è stata del 100%, ma un laboratorio non è stato in grado di riportare i risultati a causa di problemi sull'estrazione di DNA di qualità sufficiente dai campioni forniti. Non tutti i centri hanno riportato una serie completa di genotipi e fenotipi previsti, presumibilmente rispecchiando i test che avrebbero eseguito su un campione clinico simile.

Pratica clinica di routine dei laboratori partecipanti

Categorie di campioni testati nella pratica clinica:

- 45 (100%) laboratori eseguono test su campioni di pazienti correlati alla trasfusione
- 35 laboratori eseguono i test anche in altre situazioni cliniche (alcuni eseguono i test per più di un motivo):
 - 24 su campioni pazienti (campioni materni/paterni)
 - 13 su DNA fetale libero circolante nel plasma materno (cffDNA)
 - 14 su campioni donatori (screening di massa)
 - 29 su campioni donatori (per anomalie del gruppo sanguigno)

Formato del report dei risultati clinici:

- 25 riportano genotipo e fenotipo previsto nei referti medici
- 7 riportano solo il genotipo
- 12 riportano il solo fenotipo previsto

Risultati

Sono stati restituiti da quattro laboratori un totale di cinque risultati non corrispondenti al risultato di consenso per il genotipo o per il fenotipo previsto o per entrambi, con un laboratorio che ha commesso un errore in fase di test o di refertazione per più di un sistema gruppo ematico.

Tabella 1 – Test anomali e/o reporting (I risultati fuori consenso sono evidenziati)

Laboratori con errori	Campione paziente	Genotipo di consenso	Genotipo riportato	Fenotipo previsto di consenso	Fenotipo previsto riportato
A	1	RHD*01 (zigosità non determinata)	RHD*01N.01/01N.01	D positivo	D positivo
B ¹	1	RHCE*C/c	RHCE*C/C	C+c+	C+ c-
B ¹	1	KEL*02/02	KEL*01/01	K- k+	K- k+
C	1	FY*01/01	FY*01/02	Fy(a+b-)	Fy(a+b+)
D	2	DO*01/01	DO*01/02	Do(a+b-)	Do(a+b+)

¹ Questi errori sono stati fatti da un unico Centro che aveva anche registrato un'incongruenza tra il fenotipo previsto riportato CcEe selezionato dall'elenco a cascata, e la terminologia alternativa riportata nel referto per i medici per entrambi i pazienti 1 e 2.

Discussione dei risultati

Nei test dei due campioni, quattro laboratori hanno commesso un totale di cinque errori netti, e questi sono elencati nella Tabella 1. Due laboratori, codificati come C e D, sembrano aver commesso chiari errori nel test, in quanto il genotipo riportato era in linea con il fenotipo riportato previsto, ma entrambi differivano dal risultato di consenso.

Gli altri tre errori sembrano invece essere errori di inserimento o interpretativi. Il laboratorio A ha riportato l'omozigotità per la RHD *deletion*, ma ha registrato il fenotipo previsto D positivo uguale al risultato di consenso. Il laboratorio B ha commesso una combinazione di errori, registrando genotipo e fenotipo previsto errati C/c, ma ha riportato il fenotipo previsto dal consenso nella terminologia alternativa per il clinico, e ha interpretato il genotipo K/k errato, mentre il fenotipo previsto è risultato conforme al consenso.

Per il paziente 2, tutti i 41 laboratori che hanno eseguito il test per D hanno riportato il fenotipo previsto D+. Ventisette hanno riportato il genotipo come RHD*01 (zigosità non determinata), 8 come **RHD*01/01** e uno come RHD*01/01N.01. Cinque laboratori hanno selezionato 'altra terminologia': uno DD; uno Exon03/Exon05, Exon10; due RHD*01/01N.03 e uno RHD*01/07.01. RHD*01N.03 è un RHD*CE (2-9)-D gene (esoni 2-9 derivati da RHCE), e RHD*07.01 codifica la variante DVII (c.329T> C). Quale di questi genotipi è corretto non è chiaro, ma tutti codificano lo stesso fenotipo D+ dovuto alla presenza di un allele RHD*01. Sarebbe difficile rilevare l'RHD*01N.03 in presenza di RHD*01, sebbene RHD*07.01 potrebbe essere facilmente rilevato dal sequenziamento di RHD esone 2 (o con test sierologico anti-RH40)¹.

Tutti i laboratori hanno riportato il paziente 2 come KEL*01/02, K+k+, ma in aggiunta, un laboratorio ha anche riportato KEL*03/04 con un fenotipo previsto Kp (a+b+) e "Debole espressione di antigeni Kell potrebbe essere vista in presenza di Kpa". In realtà, il solo indebolimento del k sarebbe previsto quando un allele KEL che codifica Kpa è in trans con un allele KEL che codifica K.² Un altro laboratorio non ha riportato KEL*03, ma ha riportato una possibile debolezza di k, presumibilmente basandosi sulla piattaforma di genotipizzazione che rileva sia KEL*01 sia KEL*03 nello stesso campione.

La glicoproteina Kell che esprime Kpa viene trasportata alla superficie dei globuli rossi meno efficacemente rispetto alla forma più comune di glicoproteina Kell.³ Di conseguenza, la presenza del Kpa è associata con un'espressione indebolita di tutti gli antigeni del sistema Kell, sebbene questo è appena percettibile quando la forma comune di glicoproteina Kell è anche presente (cioè, fenotipo K-k+ Kp (a+b+)). Ci sono 2 situazioni in cui l'effetto Kpa è chiaramente evidente. In primo luogo, laddove viene indebolita l'espressione del k quando l'allele KEL che codifica Kpa è in trans con un allele codificante K, cosicché l'antigene k è presente solo sulla glicoproteina Kell che esprime Kpa, che è presente in quantità ridotta, e in secondo luogo quando l'allele che esprime Kpa è in trans con un allele Kell-null, nel qual caso tutti gli antigeni del sistema Kell sono espressi debolmente. Un allele KEL che codifica sia K e Kpa non è quasi mai trovato (per eccezione vedi⁴), cosicché il fenotipo K+, Kp(a+) è abbastanza raro. Il Paziente 2 è stato confermato sierologicamente essere K+ k+, Kp (a+b+), con un'espressione marginalmente indebolita di k.

Come osservato negli esercizi pre-pilota UK NEQAS/ISBT, Duffy presenta ancora un problema. Due laboratori hanno lasciato il campo per segnalare la mutazione GATA vuoto, eppure hanno riportato il fenotipo previsto come Fy (a+b-). Se questo significa che non vi era alcun test per la mutazione GATA, il fenotipo previsto non è realistico. Un laboratorio ha selezionato 'altro' per la mutazione GATA e ha dato il risultato di mutazione GATA come Fy(a)+ e il fenotipo previsto come Fy(a+b-). Questi risultati del Duffy suggeriscono una mancanza di comprensione della genetica del Duffy.

L'uso non corretto della terminologia per i fenotipi e i genotipi dei gruppi sanguigni è un problema di lunga data, e ha il potenziale di portare nella pratica a problemi di comunicazione dei risultati di genotipizzazione e fenotipizzazione. C'è una terminologia concordata a livello internazionale fornita dalla International Society of Blood Transfusion Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology Working Party (<http://www.isbtweb.org/>). Sebbene questa terminologia non può sempre essere considerata ideale per riportare i risultati al clinico, essa dovrebbe essere conosciuta dagli scienziati che utilizzano metodiche di genetica molecolare per i gruppi sanguigni.

Per facilitare il confronto dei risultati, la terminologia ISBT è stata incorporata in questo esercizio per riportare i risultati sotto forma di menù a cascata, con la richiesta di presentare i risultati in questo modo, a meno che il risultato ottenuto non poteva essere espresso utilizzando le opzioni fornite. Tuttavia, alcuni partecipanti non hanno utilizzato questo metodo di *reporting* e hanno utilizzato terminologie alternative per risultati che avrebbero potuto essere rappresentati dalle opzioni della terminologia ISBT. Ad esempio, per la segnalazione del genotipo Kell, è stato selezionato nel menu a cascata 'altro' e poi 'Kk' inserito nel campo 'altro'; o per l'RHD, è stato selezionato di nuovo 'altro' nel menu a cascata e poi inserito 'DD' nel campo 'altro'. Altri esempi di segnalazione inappropriata di genotipo erano 'e' o 's'. Dovrebbe essere evitato di riportare i risultati dei campioni EQA in questo modo, in quanto ciò rende l'analisi più difficile e introduce soggettività; terminologie alternative possono essere registrate nella sezione successiva a ciascun risultato sul modo in cui il risultato sarebbe stato trasmesso ai medici se la terminologia ISBT non fosse stata utilizzata. In altri casi, i fenotipi erano talvolta riportati nella terminologia dei genotipi e viceversa. Per esempio: fenotipi segnalati come 'Ccee' o 'kk'; genotipi segnalati come 'MNS1 (M) MNS2 (N)' o 'JK1, JK2'.

A parte qualche applicazione inadeguata della terminologia il livello generale delle prestazioni nell'esercizio è stato alto. Anche se non è possibile determinare se alcuni degli errori in questo esercizio si siano verificati nella trascrizione dei dati o siano dovuti all'interpretazione del fenotipo previsto a partire dal genotipo, è interessante notare che i test eseguiti con metodica molecolare sembrano essere inclini agli stessi errori di procedura/registrazione, come quelli visto negli esercizi EQA per i test sierologici. Questo può essere in parte dovuto alla registrazione dei risultati in un formato non familiare (cioè SurveyMonkey), ma serve a mettere in evidenza il vantaggio di eliminare passaggi manuali nella refertazione clinica con l'interfacciamento dei test e dei sistemi di refertazione.

Geoff Daniels, Jenny White, Clare Milkins 26/9/16.

References

- ¹ Rouillac C, Le Van Kim C, Beolet M, Cartron J-P, Colin Y. Leu110Pro substitution in the RhD polypeptide is responsible for the D_{VII} category blood group phenotype. *Am J Hemat* 1995;49:87-88.
- ² Daniels G. *Human Blood Groups*, 3rd edn. Wiley-Blackwell (Oxford, UK), 2013, page 291.
- ³ Ref. Yazdanbakhsh K, Lee S, Lu Q, Reid ME. Identification in a defect in the intracellular trafficking of a Kell blood group variant. *Blood* 1999;94:310-318.
- ⁴ Körmöcz G, Scharberg EA, Gassner C. A novel *KEL**1,3 allele with weak Kell antigen expression confirming the cis-modifier effect of KEL3. *Transfusion* 2009;49:733-739.