

Polimorfizm +24G>del w 3 intronie genu *ITGB3* w regionie diagnostycznym genotypowania allelu *HPA-1a*: konsekwencje i metody weryfikacji

The +24G>del polymorphism in the intron 3 of *ITGB3* gene in the diagnostic region of *HPA-1a* allele genotyping: consequences and verification methods

Katarzyna Guz¹, Magdalena Krzemieszewska¹, Agnieszka Orzińska¹, Małgorzata Uhrynowska¹, Krystyna Maślanka¹, Dorota Woźniewska³, Grażyna Nowak², Ewa Brojer¹

¹Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej Instytutu Hematologii i Transfuzjologii

²Zakład Diagnostyki Hematologicznej Instytutu Hematologii i Transfuzjologii

³Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Warszawie

Streszczenie

Wstęp: Genotypowanie antygenów *HPA-1* jest ważnym elementem badań w diagnostyce i leczeniu alloimmunologicznych małopłytkowości u płodu/novorodka (*AIMP/N*) bądź u pacjentów po przetoczeniu/przeszczepieniu. Polimorfizmy w genie *ITGB3*, w regionie przyłączania się starterów/sond do oznaczania alleli *HPA-1*, mogą zaburzać wyniki takich badań. Celem pracy było wyjaśnienie przyczyn rozbieżności typowania alleli *HPA-1* pomiędzy stosowaną dotychczas metodą *PCR-SSP*, a wprowadzonym protokołem *RQ-PCR*, określenie częstości wykrytej mutacji allelu *HPA-1a* w populacji polskiej oraz analiza wpływu jej obecności na dotychczasowe procedury diagnostyczne.

Materiał i metody: *RQ-PCR* wykonano w próbkach DNA 422 kolejnych dawców krwi i 62 osób *HPA-1b/b* wylonionych w ramach diagnostyki *AIMP/N* (58) lub powikłań poprzetoczeniowych (4), typowanych w latach 2005–2012 metodą *PCR-SSP* oraz 118 osób wyselekcjonowanych jako *HPA-1a* ujemni metodą serologiczną. Próbkę DNA z genotypem *HPA-1b/b* w *PCR-SSP* lecz *HPA-1a/b* w *RQ-PCR*, poddano sekwencjonowaniu.

Wyniki: Rozbieżność wykryto u 2 dawców krwi oraz u jednego chorego z opornością na przetaczane płytki. U wszystkich osób analiza sekwencji wykryła obecność mutacji +24G>del w 3 intronie genu *ITGB3* w regionie przyłączania startera odwrotnego używanego do *PCR-SSP*. Częstość tego polimorfizmu u nieselekcjonowanych dawców wynosi 2/422. Nie wykryto go u osób diagnozowanych w kierunku *AIMP/N* ani w grupie wyselekcjonowanej metodą serologiczną. Skorygowano protokół *PCR-SSP* i zwalidowano nową wersję testu komercyjnego.

Wnioski: Ze względu na występowanie mutacji w regionach diagnostycznych genu *ITGB3* każdy wynik genotypu *HPA-1b/b* powinien być potwierdzany przy pomocy innej techniki molekularnej lub metody serologicznej.

Słowa kluczowe: *HPA*, fałszywie-ujemne genotypowanie allelu *HPA-1a*, *PCR-SSP*, *RQ-PCR*

J. Transf. Med. 2013; 6: 33–40

Adres do korespondencji: dr n. przyr. Katarzyna Guz, Pracownia Genetyki Komórek Krwi i Chimeryzmu Zakładu Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej IHiT, ul. Chocimska 5, 00–957 Warszawa, e-mail: kguz@ihit.waw.pl; e-mail: ebrojer@ihit.waw.pl

Summary

Introduction: Genotyping of HPA-1 antigens is an important element in the diagnostics and treatment of fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia (FNAIT) as well as transfusion and transplantation related thrombocytopenias. Polymorphisms in the ITGB3 gene within the annealing region of primers/probes used for HPA-1 typing may affect the results of such research. The aim of this study was to explain the reason of discrepancy of HPA-1 genotype detection by PCR-SSP and the newly introduced RQ-PCR protocol; determine the frequency of HPA-1a allele mutation in the Polish population and its effect on the diagnostic procedures.

Material and methods: RQ-PCR was performed in DNAs from 422 consecutive blood donors and 62 HPA-1b/b patients diagnosed for FNAIT (58) or posttransfusion complications (4), genotyped in the years 2005–2012 by PCR-SSP and from 118 individuals typed as HPA-1a negative by serological method. DNA samples detected as HPA-1b/b by PCR-SSP but HPA-1a/b by RQ-PCR were sequenced.

Results: The discrepancy of the results was detected in two blood donors and in one patient with platelet refractory. In all of them sequence analysis confirmed +24G>del in the intron 3 of the ITGB3 within the region of annealing of reverse primer used for PCR-SSP. The frequency of this polymorphism in non selected blood donors was 2/422. It wasn't present in persons diagnosed toward FNAIT or in the group selected by serological method. We have revised PCR-SSP protocol and validated a new version of the commercial test.

Conclusion: Due to the mutations in the diagnostic region of ITGB3 gene each HPA-1b/b genotyping result should be confirmed using additional molecular or serological method.

Key words: HPA, false-negative HPA-1a allele genotyping, PCR-SSP, RQ-PCR

J. Transf. Med. 2013; 6: 33–40

Wstęp

Niezgodność w zakresie antygenów z układów HPA płytek krwi (*human platelet antigens*) między matką a płodem czy też biorcą a dawcą przetoczenia/przeszczepienia może prowadzić do wytworzenia alloprzeciwciał i rozwoju alloimmunologicznych małopłytkowości. Nomenklatura HPA obejmuje obecnie 23 układy: 6 biallelicznych (HPA-1 do HPA-5 oraz HPA-15), z immunogenym antygenem „a” i „b” oraz 17 hipotetycznych (HPA-6w do HPA-14w oraz HPA-16w do HPA-23w), gdzie immunogenność udowodniono wariantom „bw”. Podłożem genetycznym zmienności antygenów HPA są pojedyncze polimorfizmy punktowe (SNP, *single nucleotide polymorphism*) w genach kodujących 6 glikoprotein płytkowych (GPIIIa, GPIIb, GPIa, GPIb, GPIbb, CD109), zmieniające pojedynczy aminokwas, z wyjątkiem HPA-14bw, determinowanego delecją całego kodonu, delecja aminokwasu) [1–3].

Najistotniejszym pod względem klinicznym jest układ HPA-1. Pojedynczy polimorfizm punktowy warunkujący jego allele lokuje się w 3 eksonie genu *ITGB3* (176T>C) i odpowiada za substytucję aminokwasu Leu33 (antygen HPA-1a) na Pro33 (antygen HPA-1b) w sekwencji glikoproteiny GPIIIa (integryny $\beta 3$ stąd nazwa genu *ITGB3*).

Antygen HPA-1a jest najsilniejszym immunogenem spośród antygenów płytek. Przeciwciała do niego skierowane są najczęstszą przyczyną alloimmunologicznej małopłytkowości płodów/novorodków (AIMP/N; 75–90% przypadków; 1:2000 ciąży) [4], a także powikłań poprzetoczeniowych/poprzyszczepowych (m.in. poprzetoczeniowej skazy małopłytkowej; oporności na przetaczane płytki) [5]. Przeciwciała anty-HPA-1a wytwarzane są w odpowiedzi na ten antygen przez osoby, u których nie ma go na płytkach — czyli homozygoty pod względem antygeny HPA-1b (genotyp *HPA-1b/b*; fenotyp HPA-1a ujemny). W populacjach kaukaskich genotyp *HPA-1b/b* występuje u około 2% populacji i około 85% takich osób narażonych jest na zetknięcie się z niezgodnym antygenem HPA-1a podczas transfuzji/przeszczepienia albo ciąży (w przypadku kobiet), bowiem większość populacji jest HPA-1a dodatnia (73% to homozygoty *HPA-1a/a*, a 25% heterozygoty *HPA-1a/b*) [2, 6].

Genotypowanie antygenów HPA-1 to ważny element badań w diagnostyce i leczeniu przypadków z podejrzeniem AIMP/N czy poprzetoczeniowej/poprzyszczepowej małopłytkowości [4, 7]. Stanowi alternatywę dla metod serologicznych, które wymagają izolacji odpowiedniej liczby płytek krwi, co jest problematyczne dla próbek krwi od pacjentów z głęboką małopłytkością, szczegól-

nie od płodów/novorodków (niewielka objętość próbek). Techniki biologii molekularnej umożliwiają przeprowadzanie badań z wysoką przepustowością. W niektórych krajach wykorzystuje się je do badań przesiewowych kobiet ciężarnych w kierunku wykrywania kobiet *HPA-1b/b*, by objąć je programem rozpoznawania i leczenia AIMP/N spowodowanej immunizacją wobec antygeny HPA-1a [8]. Metody genotypowania służą też do tworzenia rejestrów dawców krwi o genotypie *HPA-1b/b*, potrzebnych do przetoczeń dla chorych z przeciwciałami anty-*HPA-1a*. Dodatkowo, płytki krwi od homozygotycznych dawców *HPA-1b/b* są konieczne do określania swoistości przeciwciał przeciwpłytkowych w laboratoriach diagnostycznych. Prawidłowe określenie genotypu *HPA-1b/b* jest więc istotne dla poprawnej diagnostyki alloimmunizacji antygenem *HPA-1a* oraz oznaczeń dawców krwi.

Na wyniki genotypowania mogą wpływać dodatkowe polimorfizmy w obrębie sekwencji przyłączania starterów czy sond. W literaturze opisywano warianty allelu *HPA-1a*, nie wykrywane przez stosowane do PCR-SSP (z ang. *polymerase chain reaction with sequence specific primers*) startery [9–11]. Dwie mutacje, +24G>del [9] i +28G>A [11], zidentyfikowano w 3 intronie genu *ITGB3*, we fragmencie, do którego komplementarny jest starter odwrotny w powszechnie używanym protokole PCR-SSP według Skogena i wsp. [12], zawartym też w komercyjnym teście HPA-SSP (INNO-Train). Obydwie mutacje generują fałszywie ujemny wynik oznaczania allelu *HPA-1a* u osób współposiadających allel *HPA-1b*, prowadząc do błędnego określenia u nich genotypu *HPA-1b/b*.

Celem prezentowanych badań było: 1) wyjaśnienie przyczyn rozbieżności wyników typowania allelu *HPA-1* pomiędzy stosowaną dotychczas metodologią PCR-SSP a wprowadzonym protokołem RQ-PCR (*real-time quantitative polymerase chain reaction*); 2) określenie częstości wykrytej mutacji allelu *HPA-1a* w populacji polskiej wraz z analizą wpływu jej obecności na dotychczasowe procedury diagnostyczne; 3) walidacja zmodernizowanej procedury PCR-SSP i nowej wersji testu komercyjnego.

Material i metody

Badania wykonano w próbkach DNA, które były w latach 2005–2012 poddane genotypowaniu antygenów *HPA-1* metodą PCR-SSP *home made* z użyciem starterów według Skogena i wsp. [12] albo komercyjnym testem HPA-SSP, obecnie test o nazwie HPA Ready Gene (INNO-Train, Diagnostik

GmbH, Niemcy). Próbki pochodziły od: 422 kolejnych dawców krwi (Grupa 1); 62 osób określonych jako *HPA-1b/b* (Grupa 2), wyłonionych w procesie diagnostyki AIMP/N (45 matek, 5 ojców; 8 płodów/novorodków) albo małopłytkowości potransfuzyjnych (4 osoby) oraz 118 osób wyselekcjonowanych metodami serologicznymi jako *HPA-1a* ujemni (Grupa 3), wśród których było 98 kobiet ciężarnych z opublikowanych badań przesiewowych [13] oraz 20 dawców krwi oznaczonych testem *HPA1a* Typing Assay (Diadem GmbH, Szwajcaria).

DNA izolowano zestawem QIAamp Mini Blood Kit (Qiagen, Niemcy) lub NucleoSpin Blood (Macherey-Nagel, Niemcy). Stężenie DNA mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 260 nm (Nanodrop) albo przez oznaczenie liczby kopii genu konstytutywnego *CCR5* w RQ-PCR.

Wszystkie próbki DNA (20 ng/PCR) były poddane dyskryminacji allelu *HPA-1* metodą RQ-PCR z allelospecyficznymi sondami MGB (*minor groove binding*), zaprojektowanymi przez Ficko i wsp. [14] z użyciem aparatu ABI Prism 7700 (Applied Biosystems) lub LightCycler 480 (Roche Diagnostics). Część próbek DNA dodatkowo badano według zmodernizowanego protokołu PCR-SSP, w którym starter odwrotny według Skogena i wsp. [12] zastąpiono starterem komplementarnym do dalszego regionu intronu 3 genu *ITGB3*, według pracy Kjaer i wsp. [9]. Jeśli wykryto allel *HPA-1a* u osoby oznaczonej wstępnie jako *HPA-1b/b*, ponownie amplifikowano produkt PCR-SSP z użyciem startera specyficznego dla allelu *HPA-1a* [12] oraz startera odwrotnego według Kjaer i wsp. [9], bez namnażania kontrolnego genu *HGH* (kodującego ludzki hormon wzrostu [*human growth hormone*]) i poddawano go sekwencjonowaniu na aparacie ABI Prism 3130 (Applied Biosystems), używając tych samych starterów do przeczytania sekwencji z obu nici DNA. Do czyszczenia produktu PCR przed sekwencjonowaniem użyto zestawu QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Germany).

Badania standaryzacyjne metody RQ-PCR oraz PCR-SSP ze starterem odwrotnym według Kjaer i wsp. [9] wykonano używając wzorcowych próbek DNA z Międzynarodowych Warsztatów Immunologii Płytek ISBT z lat 2006 i 2008.

W pracy omówione też będą wyniki genotypowania układu *HPA-1* próbek DNA przysłanych w ramach Międzynarodowych Warsztatów Immunologii Płytek *International Society of Blood Transfusion* (ISBT) w 2010 roku, gdzie dołączono 2 próbki DNA z polimorfizmami allelu *HPA-1a* w rejonie przyłączania startera odwrotnego według Skogena [12], z których jedna pochodziła z naszego labo-

ratorium. Wymiernym efektem tych warsztatów było opracowanie nowej wersji testu komercyjnego HPA Ready Gene przez firmę INNO-Train, który poddano walidacji w naszym laboratorium.

Wyniki

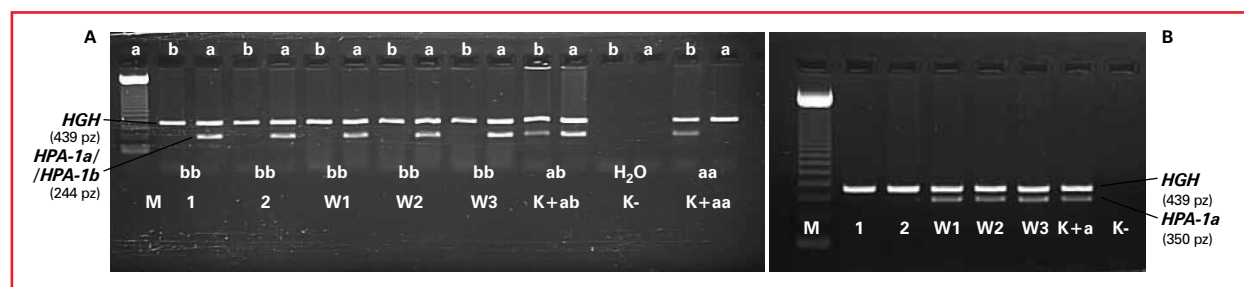
Wyniki weryfikacji oznaczania antygenów HPA-1 metodą RQ-PCR w poszczególnych grupach zamieszczono w tabeli 1. Rozbieżność pomiędzy dotychczasowymi protokołami PCR-SSP ze starterem odwrotnym według Skogena i wsp.

[12] a protokołem RQ-PCR znaleziono u 3 osób z genotypem *HPA-1b/b* według w/w PCR-SSP: u 2 dawców z Grupy 1 (2/20 tj. u 10% wśród pierwotnie *HPA-1b/b* wg *home made* PCR-SSP) oraz u jednego pacjenta z diagnostycznej Grupy 2, w podgrupie 4 osób z powikłaniami potransfuzyjnymi (tu genotypowanie wykonano zestawem komercyjnym HPA-SSP). U żadnej osoby z diagnostyki AIMP/N ani u 118 osób określonych jako HPA-1a ujemni metodą serologiczną rozbieżności wyników badań genetycznych nie było.

Tabela 1. Porównanie wyników genotypowania alleli *HPA-1* metodami PCR-SSP i RQ-PCR w 3 badanych grupach

Table 1. Comparison of the results of *HPA-1* genotyping by PCR-SSP and RQ-PCR methods in the 3 groups

		Genotyp <i>HPA-1</i>			
		PCR-SSP	RQ-PCR		
			<i>a/a</i>	<i>a/b</i>	<i>b/b</i>
Grupa 1	n = 422	<i>a/a</i>	307	0	0
		<i>a/b</i>	0	95	0
		<i>b/b</i>	0	2	18
Grupa 2:	n = 58 AIMP/N	<i>b/b</i>	–	0	58
	n = 4 małopłytkowość potransfuzyjna	<i>b/b</i>	–	1	3
Grupa 3	n = 118	<i>b/b</i>	–	0	118



Rycina 1. A — PCR-SSP wg Skogena i wsp [12]: genotypowanie allelu *HPA-1a* (linie a) oraz *HPA-1b* (linie b); M — wzorzec DNA 123pz; 1, 2 — homozygoty *HPA-1b/b* potwierdzone przez RQ-PCR [14] oraz zmodyfikowany PCR-SSP ze starterem odwrotnym wg Kjaer i wsp. [9]; W1, W2 (DNA wysłane na Warsztaty ISBT w 2010 roku), W3 — próbki DNA z rozbieżnymi wynikami genotypowania *HPA-1* w RQ-PCR i PCR-SSP ze starterem odwrotnym wg Skogena i wsp. [12]; K+ab, K+aa — kontrole próbki DNA o genotypie: *HPA-1a/b*, *HPA-1a/a*; K(–) — kontrola negatywna; **B** — zmodyfikowany PCR-SSP dla wykrywania allelu *HPA-1a* ze starterem odwrotnym wg Kjaer i wsp. [9]: M — wzorzec DNA 123pz; DNA 1, 2 — brak allelu *HPA-1a* (produktu wielkości 350 pz) u osób z poprawnym genotypem *HPA-1b/b*; W1, W2, W3 — obecny allel *HPA-1a* u osób z fałszywie ujemnymi wynikami genotypowania *HPA-1a* w PCR-SSP ze starterem odwrotnym Skogena i wsp. [12]; K+a — kontrolne DNA o genotypie *HPA-1a/b*; K(–) — kontrola negatywna

Figure 1. A — PCR-SSP according to Skogen *et al.* [12]: *HPA-1a* (a lines) and *HPA-1b* (b lines) alleles genotyping; M — DNA ladder 123 bp; 1, 2 — DNA of *HPA-1b/b* homozygous confirmed by RQ-PCR [14] and modified PCR-SSP with the reverse primer used by Kjaer *et al.* [9]; W1, W2 (DNA sent on the ISBT Workshop in 2010 year), W3 — DNA samples with discrepant *HPA-1* genotyping results in RQ-PCR and PCR-SSP with Skogen’s reverse primer [12]; K+ab, K+aa — control DNAs: *HPA-1a/b*, *HPA-1a/a* genotypes; K(–) — negative control; **B** — Modified PCR-SSP for *HPA-1a* detection with the reverse primer used by Kjaer *et al.* [9]: DNA 1, 2 — lack of *HPA-1a* (350 bp PCR products) in individuals with correct *HPA-1b/b* genotypes; W1, W2, W3 — presence of *HPA-1a* in DNA of individuals with discrepant results of *HPA-1a* genotyping by PCR-SSP with Skogen’s reverse primer [12]; K+a — control DNA with *HPA-1a/b* genotype; K(–) — negative control

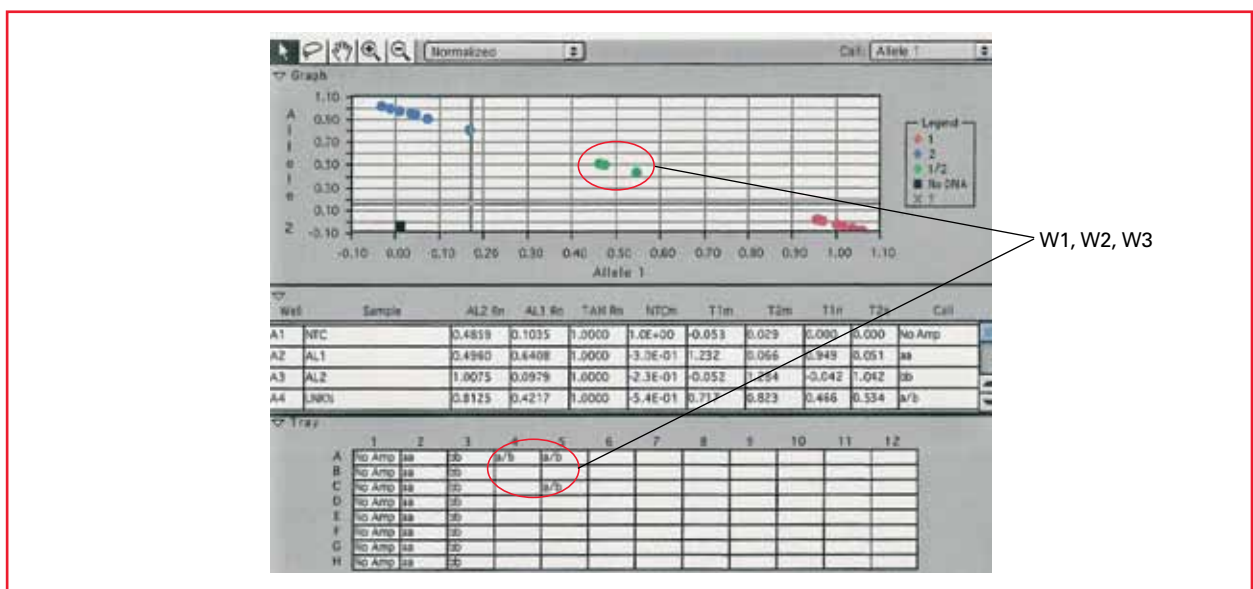
Wszystkie 3 osoby wytypowane jako *HPA-1b/b* wg PCR-SSP ze starterem odwrotnym według Skogena i wsp. [12] (ryc. 1A; DNA o nazwie W1, W2, W3) metodą RQ-PCR oznaczono jako *HPA-1a/b* (ryc. 2). Wyniki genotypowania RQ-PCR u tych osób zostały potwierdzone wykryciem allelu *HPA-1a* ze starterem odwrotnym wg Kjaer i wsp. [9] w zmodyfikowanym protokole PCR-SSP (ryc. 1B). Sekwencjonowanie wymienionych ampikonów wykazało obecność tego samego polimorfizmu +24G>del w 3 intronie genu *ITGB3* (ryc. 3), w obrębie sekwencji przyłączania startera odwrotnego według Skogena i wsp. [12].

Dyskusja

Metody genotypowania antygenów HPA, w tym najistotniejszego klinicznie układzie HPA-1 stanowią cenną alternatywę dla metod fenotypowania, z uwagi na możliwość badań na dużą skalę, z małych ilości materiału. Należy jednak pamiętać, że ich wyniki mogą być zaburzone przez występowanie polimorfizmu w obrębie sekwencji, do której przyłączają się specyficzne startery (PCR-SSP) bądź startery lub sondy (m.in. RQ-PCR). Rosnąca skala badań i rozszerzanie ich na różne grupy etniczne dostarczają przykładów błędnego genotypowania antygenów HPA-1 [9, 10, 11, 15]. Do wykrycia takich „wariantów” dochodzi podczas porównywania wyników różnych technik genotypowania. Opisane w tej pracy wyniki uzyskano

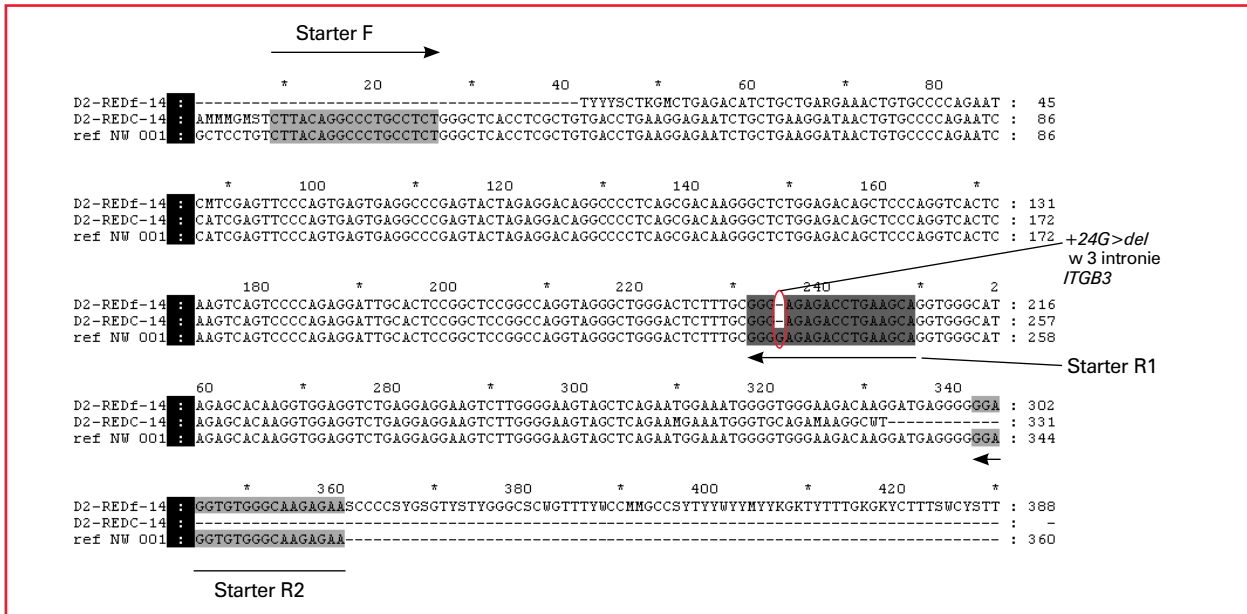
podczas badań porównawczych rutynowo używanej metody PCR-SSP ze starterami według Skogena i wsp. [12] z wynikami wprowadzanej techniki RQ-PCR [14]. U 2 dawców krwi wytypowanych według PCR-SSP jako *HPA-1b/b* zidentyfikowano obecność allelu *HPA-1a* i udowodniono za pomocą sekwencjonowania, że błędne oznaczenie wynika z polimorfizmu +24G>del w 3 intronie genu *ITGB3* kodującego allel *HPA-1a*. Polimorfizm ten został zidentyfikowany przez Kjaer i wsp. [9] podczas badań walidujących ich protokół RQ-PCR. Zaobserwowana przez autorów pracy częstość tej mutacji u dawców (2/422) jest wyższa od obserwowanej w populacji norweskiej (2/1093). W obu przypadkach, podobnie jak w pracy Kjaer i wsp [9], mutację wykryto u heterozygot *HPA-1a/b*. Należy podkreślić, że doniesienie norweskie informowało, że jedna z osób z mutacją +24G>del w 3 intronie genu *ITGB3* pochodziła z Południowo-Wschodniej Europy. Kjaer i wsp. [9] nie wykryli tej mutacji wśród 1000 osób *HPA-1a* dodatnich, używając metody PCR-SSP specyficznej dla tej delekcji. W badaniach niemieckich wykryto ją u 2/1344 osób, tylko wśród homozygot *HPA-1a/a*, co pozwoliło oszacować częstość jej występowania na 0,15% [16].

Możliwość popełnienia błędu w oznaczaniu genotypu *HPA-1b/b* skłoniła nas do weryfikacji metodą RQ-PCR wszystkich archiwalnych wyników *HPA-1b/b* uzyskanych w badaniach diagnostycznych przy użyciu metody PCR-SSP: *home made* oraz testów HPA-SSP i HPA Ready Gene



Rycina 2. Dyskryminacja alleli *HPA-1* metodą RQ-PCR [14] — wykrycie genotypu *HPA-1a/b* w próbkach DNA — W1, W2 i W3, pierwotnie genotypowanych jako *HPA-1b/b* w PCR-SSP ze starterami wg Skogena i wsp. [12]

Figure 2. *HPA-1* alleles discrimination by RQ-PCR [14] — presence of *HPA-1a/b* genotype in W1,W2,W3 DNA samples previously genotyped as *HPA-1b/b* by PCR-SSP with Skogen’s primers [12]



Rycina 3: Wykrycie mutacji +24G>del w 3 intronie genu *ITGB3* u dawcy W2, w sekwencji produktu PCR-SSP uzyskanego ze startera specyficznego dla allelu *HPA-1a* (F, sekwencja wyróżniona jasnoszarym kolorem) i startera odwrotnego wg Kjaer i wsp. (R2) [9]: D2-REDf-14 - sekwencja W2 odczytana z użyciem startera F; D2-REDC-14 — sekwencja W2 odczytana z użyciem startera R2; ref NW_001 — sekwencja referencyjna genu *ITGB3* (NW 001838448.1 — region od 29468 do 29836 nukleotydu); regiony przyłączenia poszczególnych starterów wyróżniono kolorami: starter F i R2 — jasnoszary, starter odwrotny (R1) wg Skogena i wsp. [12] — ciemnoszary

Figure 3. Detection of the +24G>del mutation in the intron 3 of *ITGB3* gene in donor W2 within a sequence of PCR-SSP product obtained using *HPA-1a* specific primer (F) and reverse primer (R2) acc to Kjaer *et al.* [9]: D2-REDf-14 — sequence of W2 read by using F primer; D2-REDC-14 — sequence of W2 read by using R2 primer; ref NW_001 — reference sequence of *ITGB3* gene (NW 001838448.1 — the region from 29468 to 29836 nucleotide); regions of primer annealing marked by colours: F and R2 primers – light gray, Skogena’s reverse primer (R1) [12] — dark gray

firmy INNO-Train. Wykazano, że u jednej osoby błędnie określono genotyp testem komercyjnym HPA-SSP jako *HPA-1b/b*, mimo że była *HPA-1a/b*. Za pomocą sekwencjonowania potwierdzono obecność allelu *HPA-1a* z mutacją +24G>del w 3 intronie *ITGB3*. Był nią pacjent z opornością na przetaczane płytki. Wstępny wynik sugerował potencjalną możliwość immunizacji antygenem *HPA-1a* u chorego *HPA-1b/b* i stanowił przykład błędnego tropu diagnostycznego. U chorego nie wykryto przeciwciał anty-*HPA-1a*, co poddawało w wątpliwość alloimmunizację antygenem *HPA-1a*.

Nie znaleziono natomiast błędu genotypowania wśród osób *HPA-1b/b* diagnozowanych z powodu podejrzenia AIMP/N (matki, ojcowie bądź płody/novorodki). W grupie tej znajdowały się osoby skierowane na badania diagnostyczne z powodu klinicznych objawów, sugerujących AIMP/N, której najczęstszą przyczyną są przeciwciała anty-*HPA-1a*. Była to więc grupa wybitnie wyselekcjonowana.

W tym kontekście warto przedyskutować potencjalne konsekwencje popełnienia błędu diag-

nostycznego, polegającego na niewykryciu allelu *HPA-1a*. Mają one różną wagę w różnych sytuacjach klinicznych.

Niewykrycie allelu *HPA-1a* u dawcy krwi i błędne określenie go jako dawcy *HPA-1a* ujemnego (o genotypie *HPA-1b/b*) może prowadzić do przetoczenia niezgodnego serologicznie koncentratu krwinek płytkowych (KKP), jeśli taki preparat byłby wybrany do leczenia małopłytkowości, spowodowanej przeciwciałami anty-*HPA-1a*. Skutkiem tego mógłby być niesatysfakcjonujący odzysk płytek po przetoczeniu oraz pogłębienie alloimmunizacji. Podawanie KKP niezawierającego antygeny *HPA-1a*, do którego skierowane są przeciwciała u matki jest powszechnie rekomendowane przy leczeniu AIMP/N, choć jak wykazały wyniki badań Kiefela i wsp. [17], przetoczenie płytek od przypadkowego dawcy jest też częściowo skuteczne.

Niewykrycie allelu *HPA-1a* u płodu/novorodka matki z przeciwciałami anty-*HPA-1a* (czy pośrednio u ojca dziecka) może doprowadzić do wykluczenia konfliktu *HPA-1a* u dziecka, które wymaga podjęcia stosownego leczenia, zwłaszcza

dopłodowego, jeśli diagnostyka została wdrożona jeszcze w czasie ciąży.

Błędne oznaczenie genotypu jako *HPA-1b/b*, mimo że faktycznie jest on *HPA-1a/b*, u matki z podejrzeniem konfliktu HPA lub u biorcy przetoczenia/przeszczepienia z objawami małopłytkowości, bez wykrywalnych przeciwciał, może prowadzić do zaniechania dociekania niezgodności antygenowej w innych układach HPA. Wiadomo bowiem, że niekiedy objawy małopłytkowości uprzedzają pojawienie się wykrywalnego poziomu przeciwciał anty-*HPA-1a* [4]. Taki przykład błędnego tropu diagnostycznego stanowi doniesienie Esquirola i wsp. [18], w którym opisano przypadek zaniechania dalszej diagnostyki AIMP/N po stwierdzeniu u matki genotypu *HPA-1b/b* z użyciem PCR-SSP według Klutera i wsp [19]. W rzeczywistości posiadała ona allel *HPA-1a* z mutacją *262T>C*, a objawy AIMP/N wywołały obecne u niej przeciwciała anty-*HPA-2b*.

Błędne oznaczenie genotypu *HPA-1b/b* u kobiety ciężarnej w badaniach przesiewowych wiąże się natomiast z niepotrzebnym podjęciem kolejnych badań diagnostycznych (m.in. badania przeciwciał anty-*HPA-1a*) i naraża kobietę na stres związany w wykryciem domniemanego konfliktu *HPA-1a*. Wprowadzenie badań przesiewowych u ciężarnych w kierunku konfliktu *HPA-1a*, analogicznych do tych w konflikcie RhD, wydaje się coraz bardziej prawdopodobne, między innymi ze względu na otwierające się możliwości immunoprofilaktyki [20].

Metody genotypowania antygenów HPA, zwłaszcza *HPA-1* muszą być więc poddawane stałej weryfikacji. Takie przesłanie towarzyszy organizatorom Warsztatów Immunologii Płytek ISBT, które od 1998 roku dotyczą też badań genetycznych. Do 2008 roku większość błędnych wyników dotyczyła genotypowania antygenów *HPA-3* i *HPA-5*. W 2010 roku po raz pierwszy najwięcej błędów zdarzyło się w typowaniu alleli *HPA-1*, za sprawą włączenia do zestawu testowego, składającego się z 6 próbek DNA — 2 próbek z wariantami allelu *HPA-1a* (+28G>A; +24G>del w 3 intronie *ITGB3*), w tym jednej pochodzącej z naszego laboratorium. Organizatorzy Warsztatów obie te próbki opisali w krótkim doniesieniu [16].

Wyniki laboratorium autorów niniejszej pracy były prawidłowe, bo dla weryfikacji wyników testu *HPA-SSP* zastosowano metody opisywane w obecnej pracy. Pod wpływem wniosków z podsumowania błędów popełnionych przez laboratoria referencyjne w 2010 roku, firma INNO-Train zmodernizowała protokół wykrywania allelu *HPA-1a*.

W obecnym formacie uzyskiwane przy jego użyciu wyniki są prawidłowe, niezaburzone przez mutację +24G>del w 3 intronie *ITGB3*, co potwierdzono podczas jego walidacji (wyniki niepokazane w obecnej pracy). Sądząc po wielkości uzyskiwanego produktu PCR (185 pz zamiast 244 pz), podmieniono w nim starter odwrotny według Skogena i wsp. [12] na starter odwrotny według Klutera i wsp. [19], w którym lokuje się mutacja *262T>C* allelu *HPA-1a* opisana przez Bertranda i wsp. [10]. Teraz z kolei istnieje niebezpieczeństwo niewykrywania mutacji *262T>C*, która występuje z wysoką częstością w populacjach wywodzących się z Afryki (7,1% Tunezja, 17,5% Kamerun), choć nie wykryto jej wśród francuskich dawców krwi o kaukaskim pochodzeniu. Opisana przez Esquirola i wsp. kobieta z tą mutacją była Kubanką [18].

Kolejny wariant genu *ITGB3* w rejonie okalającym polimorfizm determinujący antygeny *HPA-1a* i *-1b* wykrył Santoso i wsp. [21]: to *175C>G* tuż przed SNP determinującym *HPA-1*, który generuje zamianę Leu33 na Val33 (część przeciwciał anty-*HPA-1a* nie rozpoznaje epitopu z Val33). Tutaj błędne typowanie *HPA-1b/b* spowodowane było brakiem hybrydyzacji sondy MGB specyficznej dla allelu *HPA-1a* w RQ-PCR z opisanym wariantem *ITGB3*, nazwanym allelem *HPA-1c*. Wariant ten znaleziono u 1/1910 pacjentów z zakrzepicą, lecz nie wykryto go wśród prawie 3000 dawców krwi.

Wnioskiem końcowym, płynącym z powyższej dyskusji nad wynikami badań własnych, postulowanym też przez Bertranda i wsp. [11] oraz Bugerta i wsp.[16] jest konieczność weryfikowania każdego wyniku genotypu *HPA-1b/b* inną techniką PCR, korzystającą z innego zestawu starterów/sond albo oznaczeniem u takich osób fenotypu *HPA-1a* metodami serologicznymi. Wprowadzenie odpowiednich procedur jest konieczne ze względu na omówioną powyżej wysoką częstość polimorfizmów dotyczących regionu genu *ITGB3*, który poddaje się analizie dla identyfikacji alleli *HPA-1a* i *-1b*. Jest to istotne szczególnie ze względu na podnoszoną w literaturze przydatność wysoko wydajnych przesiewowych metod genotypowania antygenów HPA u krwiodawców oraz u kobiet ciężarnych dla rozpoznawania konfliktów *HPA-1a* [22].

Piśmiennictwo:

1. Metcalfe P, Watkins N.A., Ouwehand WH i wsp. Nomenclature of human platelet antigens. Vox Sang. 2003; 85: 240–245.
2. <http://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/table2.html>
3. Peterson J.A., Pechauer S.M., Gitter M.L. i wsp. New platelet glycoprotein polymorphisms causing maternal immunization and neonatal alloimmune thrombocytopenia. Transfusion 2012; 52: 1117–1124.

4. Uhrynowska M., Niznikowska-Marks M., Zupańska B. Neonatal and maternal thrombocytopenia: incidence and immune background. *Eur. J. Haematol.* 2000; 64: 42–46.
5. Warkentin T.E., Smith J.W. The alloimmune thrombocytopenic syndromes. *Transfus. Med. Rev.* 1997; 11: 296–307.
6. Drzewek K., Brojer E., Zupańska B. The frequency of human platelet antigen (HPA) genotypes in the Polish population. *Transfus. Med.* 1998; 8: 339–342.
7. Curtis B.R., McFarland J.G. Detection and identification of platelet antibodies and antigens in the clinical laboratory. *Immunohematology* 2009; 25: 125–135.
8. Kjeldsen-Kragh J., Killie M.K., Tomter G. i wsp. A screening and intervention program aimed to reduce mortality and serious morbidity associated with severe neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood* 2007; 110: 833–839.
9. Kjaer K.M., Jaegtvik S., Husebekk A., Skogen B. Human platelet antigen 1 (HPA 1) genotyping with 5' nuclease assay and sequence-specific primers reveals a single nucleotide deletion in intron 2 of the HPA 1a allele of platelet glycoprotein IIIa. *Br. J. Haematol.* 2002; 117: 405–408.
10. Bertrand G., Bianchi F., Chenet C. i wsp. New mutation in the platelet beta3-integrin gene: implication for the diagnosis of fetomaternal alloimmunization. *Transfusion* 2006; 46: 2138–2141.
11. Bertrand G., Kaplan C., Kennel A., Perrier P., Moncharmont P. New mutation in the beta 3-integrin (GPIIIa) gene inducing HPA-1 genotyping discrepancies. *Transfusion* 2010; 50: 1589–1591.
12. Skogen B., Bellissimo D.B., Hessner M.J. i wsp. Rapid determination of platelet alloantigen genotypes by polymerase chain reaction using allele-specific primers. *Transfusion* 1994; 34: 955–60.
13. Maślanka K., Guz K., Zupańska B. i wsp. Antenatal screening of unselected pregnant women for HPA-1a antigen, antibody and alloimmune thrombocytopenia. *Vox Sang.* 2003; 65: 326–327.
14. Ficko T., Galvani V., Ruprecht R., Dovc T., Rozman P. Real-time PCR genotyping of human platelet alloantigens HPA-1, HPA-2, HPA-3 and HPA-5 is superior to the standard PCR-SSP method. *Transfus. Med.* 2004; 14: 425–32.
15. Bertrand G., Kaplan C. The 262T>C silent mutation of the platelet B3-integrin gene is not restricted to a single family. *Transfusion* 2008; 48: 402.
16. Bugert P., Nguyen X.D., Klüter H., Panzer S. Frequency of glycoprotein IIIa gene variants that cause HPA-1 genotyping discrepancies. *Vox Sang.* 2010; 99: 299–300.
17. Kiefel V., Bassler D., Kroll H. i wsp. Antigen-positive platelet transfusion in neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT). *Blood* 2006; 107: 3761–3763.
18. Esquirol A., Canals C., Ibáñez M. i wsp. Foetal-neonatal alloimmune thrombocytopenia due to anti-HPA-2b antibodies present in the serum of a mother initially mistyped as HPA-1a negative. *Blood Transfus.* 2012; 10: 390–392.
19. Klüter H., Fehlau K., Panzer S., Kirchner H., Bein G. Rapid typing for human platelet antigen systems-1, -2, -3 and -5 by PCR amplification with sequence-specific primers. *Vox Sang.* 1996; 71: 121–125.
20. Tiller H., Killie M.K., Chen P. i wsp. Toward a prophylaxis against fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: induction of antibody-mediated immune suppression and prevention of severe clinical complications in a murine model. *Transfusion* 2012; 52: 1446–1457.
21. Santoso S., Kroll H., Andrei-Selmer C.L. i wsp. A naturally occurring Leu33Val mutation in beta3-integrin impairs the HPA-1a epitope: the third allele of HPA-1. *Transfusion* 2006; 46: 790–799.
22. Nogues N. Molecular testing for platelet and granulocyte antigens. *ISBT Science Series* 2011; 6: 7–12.