

# Przegląd metod genotypowania antygenów krwinek czerwonych

w świetle doniesień prezentowanych na 23. Zjeździe Międzynarodowego Towarzystwa Przetaczania Krwi w Amsterdamie

Review of methods for blood group genotyping  
 presented during the 23<sup>rd</sup> Regional Congress of the  
 International Society of Blood Transfusion in Amsterdam

Katarzyna Guz, Agnieszka Orzińska, Ewa Brojer

Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej  
 Instytut Hematologii i Transfuzjologii

Zastosowanie biologii molekularnej w badaniach antygenów krwinek czerwonych omawiano na trzech sesjach 23. Regionalnego Zjazdu Międzynarodowego Towarzystwa Przetaczania Krwi (ISBT, *International Society of Blood Transfusion*). Pierwsza sesja zatytułowana *Use of Genomics for Decision-Making in Transfusion Medicine* zorganizowana została w ramach Akademii ISBT i miała charakter wprowadzający. Wykłady Westhoff z Wielkiej Brytanii (*Recipient-Donor Focus*) [1] i Peyrard z Francji (*Laboratory Practise*) [2] w wielu elementach pokrywały się i generalnie skupiały na opisie zastosowań praktycznych metod genotypowania antygenów erytrocytów. Dlatego informacje z obu prelekcji będą omówione wspólnie. W tabeli 1 zestawiono wykaz przytaczanych przez wykładców zastosowań i powodów ich wykorzystywania.

Laboratoria referencyjne stosują metody biologii molekularnej w sytuacjach, w których techniki serologiczne napotykać na trudności z wykryciem antygeny lub z określeniem swoistości przeciwciał. Metody te są stosowane w badaniach u chorych, którzy niedawno dostali transfuzję lub u których stwierdza się silne opłaszczenie krwinek czerwonych przeciwciałami (dodatni bezpośredni test antyglobulinowy — BTA). Peyrard podkreślał, że przy zastosowaniu obecnie używanych metod, opartych głównie na technikach PCR-SSP (reakcja PCR z primerami swoistymi dla alleli [*polymerase chain reaction-single*

*specific primer*]), nie ma obawy, by leukocyty obecne w przetaczanych składnikach krwi powodowały fałszywe wyniki genotypowania. Obydwoje wykładowcy doceniali rolę badań molekularnych u chorych z niepowtarzalnymi wynikami oznaczania antygenów Rh i ABO, szczególnie tych, u których jest słaba ekspresja tych antygenów lub obniżone stężenie izoaglutynin. Metody genotypowania stosuje się też w sytuacjach, gdy konieczne jest oznaczenie antygeny, dla którego nie są dostępne odczynniki diagnostyczne. Dotyczy to określania wielu antygenów o wysokiej i niskiej częstości występowania (wymienione w tab. 1). Surowice z przeciwciałami anti-Do<sup>a</sup>, anti-Do<sup>b</sup> i z przeciwciałami do antygenów układu Knops mają na ogół bardzo niską aktywność. Dla tych ostatnich techniki genotypowania zastąpiły więc całkowicie metody serologiczne.

Peyrard podkreślał również przydatność genotypowania antygenów erytrocytów przy doborze panelu dawców do identyfikacji przeciwciał. Istotne jest, by w panelu takim znajdowały się krwinki zawierające antygeny o niskiej częstości występowania, szczególnie te, do których skierowane mogą być przeciwciała istotne klinicznie. Z drugiej strony ważne, aby tacy dawcy nie posiadali antygenów, do których mogą być skierowane przeciwciała stosunkowo często występujące u chorych, lecz klinicznie nieistotne (np. naturalnie występujące anti-Wr<sup>a</sup> i anti-V<sup>w</sup>).

**Adres do korespondencji:** dr n. biol. Katarzyna Guz, Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej IHiT, 00-975 Warszawa, ul. Chocimska 5, tel.: 22 349 66 00 wew. 154, faks: 22 349 66 14, e-mail: kguz@ihit.waw.pl, orzinska@ihit.waw.pl, ebrojer@ihit.waw.pl

**Tabela 1.** Zastosowanie metod biologii molekularnej w immunohematologii krwinek czerwonych wg Westhoff [1] i Peyrard [2]**Table 1.** Molecular biology methods in red blood cell immunohematology according to Westhoff [1] i Peyrard [2]

Przydatność genotypowania	Problemy metod serologicznych
<b>Aplikacje dla pacjentów</b>	
<b>1. Ustalanie wnioskowanego fenotypu:</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>po wielokrotnych transfuzjach</li> <li>gdy wynik BTA+</li> <li>gdy podejrzenie immunizacji w powszechnych/rzadkich antygenach</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ koegzystencja mieszanych populacji krwinek czerwonych do 4 mcy po przetoczeniu</li> <li>→ problemy w oznaczaniu Jk<sup>a</sup>/Jk<sup>b</sup>, Do<sup>a</sup>/Do<sup>b</sup>; k</li> <li>→ mała dostępność/brak surowic diagnostycznych (np. anty-VS, -Yt<sup>b</sup>; -Js<sup>a</sup>, -Vel, -Co<sup>a</sup>)</li> </ul>
<b>2. Pomoc w identyfikacji alloprzeciwciał:</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>przewidywanie częstych homozygot (Fy<sup>a</sup>; Fy<sup>b</sup>, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>, S, s)</li> <li>przewidywanie obecności/braku korespondującego antygeny do podejrzewanych przeciwciał</li> <li>pomoc w rozróżnianiu allo- od auto-przeciwciał</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ problemy, jak słaba ekspresja antygeny np. czy fenotyp Fy(b+ słabe) czy Fy(a-b-)</li> <li>→ mała dostępność/brak krwinek z ekspresją rzadkich antygenów lub homozygot w kilku antygenach</li> <li>→ np. problemy przy reaktywnościach anty-e, -ce, -Ce</li> </ul>
<b>3. Dociekanie przyczyn rozbieżności oznaczeń serologicznych — identyfikacja wariantów:</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>geny <i>RHD</i> z ekspresją D słabe, D częściowe, Del u osób Rh ujemnych</li> <li>geny <i>RHCE</i> z nietypową ekspresją antygenów C i/lub e</li> <li>geny <i>ABO</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ problemy rozróżniania wariantów D, które są narażone na immunizację antygenem D</li> <li>→ problemy u pacjentów z anemią sierpowatą z nietypowymi białkami RhCe, Rhce</li> </ul>
<b>Aplikacje dla krwiodawców:</b>	
<b>1. Masowe oznaczanie dla rejestrów dawców krwi i tworzenia paneli krwinek wzorcowych</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>poszukiwanie homozygot w antygenach C/c, E/e, K, Fy<sup>a</sup>/Fy<sup>b</sup>, Jk<sup>a</sup>/Jk<sup>b</sup>, MNS (różnych kombinacji)</li> <li>poszukiwanie ujemnych fenotypów w antygenach powszechnych [k-, Kp(b-), Js(b-), Lu(b-), Jr(a-), Lan-, Vel-]</li> <li>poszukiwanie fenotypów z ekspresją rzadkich antygenów (VS, Js<sup>a</sup>, Co<sup>b</sup>, Yt<sup>b</sup>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ osobne badania, koszty/czasochłonne</li> <li>→ mała dostępność lub brak surowic diagnostycznych; duży koszt masowego używania surowic np. anty-k, -Lu<sup>b</sup>, -Kp<sup>b</sup></li> </ul>
<b>2. Dociekanie przyczyn rozbieżności oznaczeń serologicznych — identyfikacja wariantów:</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>genów <i>RHD</i></li> <li>geny <i>ABO</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ problemy rozróżniania D częściowe a D słabe; adsorpcja/elucja dla wykrycia Del</li> <li>→ brak jednoznacznych kryteriów oceny obniżonej ekspresji antygenów lub obniżonego poziomu aglutynin</li> </ul>

W badaniach dawców metody molekularne są istotnym narzędziem przesiewowym do wyszukiwania dawców, którzy nie posiadają antygeny, do którego skierowane są przeciwciała obecne u chorego. Stosuje się je też do ustalania statusu RhD u dawców RhD ujemnych lub ze słabą ekspresją antygeny D i na podstawie wykrytego typu wariantu genu *RHD* reklasyfikuje się dawcę z grupy RhD ujemnych do RhD dodatnich (D słabe, D częściowe, Del) lub pozostawia w grupie RhD ujemnych, jako nosiciela nieaktywnego genu *RHD*. Westhoff podkreślała, że wiele przeprowadzonych w różnych

ośrodkach badań wykazuje wysoką zgodność wyników genotypowania i fenotypowania. Nieliczne rozbieżności występują w przypadkach, gdy na brak ekspresji antygeny wpływa mutacja znajdująca się w innych regionach genu niż te poddawane analizie lub gdy mutacje dotyczą innego współodpowiedzialnego za ekspresję genu. Zdaniem Westhoff należy liczyć się z tym, że w nieodległej przyszłości typowanie antygenów krwinek czerwonych będzie opierało się na metodach analizy DNA, a nie na serologii. Do tego czasu trzeba poznać wszystkie możliwości, jakie dają, w tym również ograniczenia

w odniesieniu do identyfikowania grup krwi. Trzeba je dobrze poznać, abyśmy znali ich ograniczenia jak znane są ograniczenia serologii.

Trzecim wykładem sesji była prezentacja Masji de Haas z Amsterdamu [3]. Omówiła ona aktualny stan badań prenatalnych w konfliktach serologicznych, jako ważnej aplikacji oznaczeń grup krwi płodu z DNA obecnego w osoczu matki. W ciągu ostatniego dziesięciolecia do badań rutynowych zostało dołączone badanie alleli genów kodujących antygeny RhD, RhC, Rhc, RhE i K płodu w konfliktach czerwokrwinkowych, a także antygeny HPA-1a w konflikcie płytkowym. Dodatkowo w niektórych krajach nieinwazyjne oznaczanie *RHD* płodu zostało włączone w procedurę kwalifikacji do podawania immunoglobuliny anti-D w trakcie ciąży. Nie trzeba jej podawać u 40% kobiet RhD ujemnych, które noszą *RHD* ujemny płód. Dzięki temu uzyskuje się znaczne oszczędności immunoglobuliny, a kobiet nie naraża na podanie preparatu krwiopochodnego.

Druga sesja zorganizowana przez firmę Grifols pt. *Can Blood Group Genotyping Really Solve Current Laboratory Challenge* oraz kolejna pt. *New Technology for Blood Group Typing* — poświęcone były technologiom i aparaturze do genotypowania antygenów krwinek czerwonych i płytkowych. Dyskutowano o perspektywach wprowadzenia masowych badań molekularnych do oznaczeń antygenów krwinek czerwonych u krwiodawców. Wszyscy wykładowcy podkreślali, że analizy molekularne będą połączone z opracowaniem komputerowych baz danych dawców z przewidywanym/określonym fenotypem. Spośród nich dobrać będzie można dawców dla chorych z przeciwciałami. Dostępność takich baz danych spowoduje skrócenie czasu oczekiwania na przetoczenie krwi zimmunizowanym chorym.

Wykładowcy zaproszeni przez firmę Grifols prezentowali wyniki własnych badań z wykorzystaniem zestawów firmy Progenika, których dystrybucję prowadzi firma Grifols. Katri Haimila z Fińskiego Czerwonego Krzyża omówiała efekty rutynowego używania zestawu ID Core+ (technologia Luminex) do oznaczania 33 antygenów z 9 układów grupowych: RhCE, KEL, JK, FY, MNS, DI, DO, CO, YT). Nuria Nogues z Banc de Sang i Teixits z Barcelony prezentowała wyniki badań z wykorzystaniem szerokospektralnej mikromacierzy DNA (BloodChip Reference), która identyfikuje 128 antygenów z 9 układów grup krwi i 12 układów HPA. Wśród jego zalet wymieniała możliwość określenia wielu wariantów allelicznych genów *ABO*(58), *RHD*(115) i *RHCE*(9). Tę metodologię skonstrastowała z rutynowym używaniem do nie-

których aplikacji mniej bogatych zestawów do identyfikacji antygenów erytrocytów lub płytek w technologii Luminex (ID Core dla 23 antygenów z 5 układów grup krwi; w/w ID Core+ oraz ID HPA dla antygenów HPA-1-11 i HPA-15). Ostatni wykład Mindy Goldman z Kanady dotyczył korzystania z usługi BloodChip Service, pozwalającej badać odpłatnie nietypowe próbki DNA w laboratorium macierzystym firmy Progenika.

Trzecią sesję zapoczątkował wykład profesora Watkina z Wielkiej Brytanii (*NHS Blood and Transplant*) pt. *Blood Group Genotyping — SNPs to Sequencing* [4], w którym autor przedstawił przegląd metodologii badań molekularnych antygenów krwinek czerwonych i ich aktualne oraz przyszłe zastosowania (streszczenia 4A-S34 nie zamieszczono w materiałach zjazdowych). Na wstępie zaprezentował stan badań molekularnych w laboratorium referencyjnym w Bristolu (IBGRL, *International Blood Group Reference Laboratory*), gdzie metody te stosowane są od 2003 roku, przede wszystkim u chorych, w skali 200–300 rocznie. Aktualnie stosowaną metodologią jest technika *real-time* PCR z sondami TaqMan, a rutynowo oznaczane są antygeny Rh, K/k, Fy, Jk i MNS. Dodatkowo można rozszerzyć analizę o antygeny  $Do^{a/b}$ ,  $Js^{a/b}$ ,  $Kp^{a/b}$ , VS,  $Fy^x$ . W pilnych przypadkach wyniki dostępne są w dniu dostarczenia próbki.

Odnosząc się do przyszłych zastosowań biologii molekularnej Watkins stwierdził, że wyzwaniem dla brytyjskiej służby krwi jest z jednej strony ograniczenie alloimmunizacji u chorych zależnych od przetoczeń, przede wszystkim u chorych z anemią sierpowatą i talasemią, z drugiej zwiększanie liczebności banku i rejestru dawców o rzadkich fenotypach dla chorych z przeciwciałami do takich antygenów. Podkreślił, że zaletą metod genotypowania jest możliwość masowych badań, większa powtarzalność niż technik fenotypowania, a przy dużej skali badań, niższe koszty.

Na dowód wysokiej wiarygodności metod molekularnych Watkins przedstawił porównanie wyników trzech dostępnych komercyjnych platform do genotypowania grup krwi. Dwie opierały się na technologii biochipów (BloodChip, Progenika i HEA BeadChip, BioArray), jedna na technologii Luminex (ID Core, Progenika). Pierwsze z nich pozwalają na wytypowanie znacznej liczby alleli i mają niższą przepustowość. Trzecia platforma obejmuje mniej alleli, ale ma wysoką przepustowość i jest bardziej dostępna dla laboratoriów wykorzystujących technologię Luminex do innych badań (np. do genotypowania HLA). Analizowano korelacje wyników 20 266 oznaczeń różnych antygenów

grupowych wykonanych za pomocą metod serologicznych i trzech wyżej wymienionych platform do badań genetycznych. Rozbieżność wyników między 3 platformami zaobserwowano w 8 przypadkach (0.04%), a rozbieżność z danymi serologicznymi zawartymi w systemie komputerowym (PULSE) uzyskano ogółem dla 44 antygenów: 37/15 075 (0.25%) dla platformy 1; 35/13 660 (0.26%) dla platformy 2 i 29/14 639 (0.20%) platformy 3. Stwierdzono, że platforma 2 (HEA BeadChip) miała „kłopoty” z typowaniem antygenów RhC i RhE, lecz po modyfikacji producenta poprawiona wersja odczynników dała wyniki poprawne. Ponowne ustalanie fenotypu udało się powtórzyć u 18/44 dawców; niektóre wieloma metodami, a u części osób ostateczny fenotyp mógł być ustalony dopiero po badaniach rodzinnych. We wszystkich 18 przypadkach stwierdzono, że dane zawarte w systemie PULSE były błędne, a wyniki badań molekularnych prawidłowe. Na technologii genetycznej można więc polegać i można nią zastępować badania serologiczne.

Jako przykład efektywności stosowania metod molekularnych do poszukiwania dawców o rzadkich fenotypach, Watkins przytoczył osiągnięcia amerykańskiego programu dla dawców pochodzenia afro-amerykańskiego w Wisconsin. Wśród 25 000 dawców oznaczanych na obecność 43 antygenów, w ciągu zaledwie 9 tygodni znaleziono 650 osób o genotypie spełniającym kryteria dawców o rzadkich fenotypach: 150 osób ujemnych w antygenach powszechnych, 200 dawców o innych rzadko występujących fenotypach; 300 dawców DCCee, DccEE, Dccee, negatywnych w innych immunogenach antygenach. Zidentyfikowano też znaczną liczbę dawców k ujemnych, których dzięki tym badaniom przestano klasyfikować, jako dawców o rzadkiej grupie. Wprowadzenie typowania molekularnego w Wisconsin spowodowało redukcję niezrealizowanych zapotrzebowań na krew rzadkich grup ogółem o 2% (z 9.5% do 7.5%), w tym dla 5 fenotypów: U-, Jo(a-), Hy-, Kp(b-), Lu(b-) brak realizacji spadł z 38% do 0%, zaś dla Js(b-) do 1.6%.

W dalszej części wykładu Watkins podkreślał, że obecnie dostępne metody genotypowania mogą być jedynie używane do omówionych wyżej celów — czyli genotypowania tzw. rozszerzonego fenotypu oraz poszukiwania dawców nieposiadających antygenów o wysokiej częstości występowania w wybranych grupach krwiodawców. Do powszechnych badań u krwiodawców konieczna jest dostępność systemów „typu czarna skrzynka”. Wśród takich technologii przyszłości, Watkins omówił dwie: *Genome-wide SNP Typing* (narzędzie do

analiz GWAS [*Genome-Wide Association Study*]) i sekwencjonowanie nowej generacji (NGS, *Next Generation Sequencing*), które będą mogły być sprzężone z odpowiednimi programami komputerowymi, które wyselekcjonują informacje o posiadanym genotypie grup krwi. Watkins stwierdził, że Wielka Brytania bardzo wiele inwestuje w projekty dotyczące badań genomu ludzkiego i w najbliższej przyszłości planuje m.in. wdrożyć technologie NGS do przewidywania grup krwi płodu z osocza matki.

Na koniec wykładowca podkreślił, że w ciągu najbliższych 10 lat technologie molekularne umożliwią genotypowanie wszystkich antygenów u dawców i biorców. Dane te będą gromadzone w odpowiednich bazach i analizowane komputerowo. Krew będzie można przetaczać bez próby krzyżowej, co fundamentalnie zmieni aktualną praktykę. Dla zobrazowania kosztów perspektywnego dobierania krwi zgodnej antygenowo dla przeciwdziałania alloimmunizacji Watkins powołał się na wyniki analiz opublikowanych przez Kackera i wsp. [5]. Wprowadzenie zasady doboru częściowo zgodnego dawcy (w antygenach C, E, K) dla 85 000 chorych z anemią sierpowatą, z których 10% wymaga ciągłych przetoczeń, spowoduje w czasie 10 lat spadek liczby alloimmunizacji o 2072. Koszty takiej procedury wyniosą 765 milionów dolarów. Wprowadzenie zasady rozszerzonego doboru (ang. *extensive matching*; zgodność w C/c, E/e, K, Fy<sup>a/b</sup>, Jk<sup>a/b</sup>, S/s) kosztowałoby 1,86 miliarda dolarów więcej i mogłoby zapobiec około 2424 przypadkom alloimmunizacji. Przeciwdziałanie pojedynczemu epizodowi alloimmunizacji wyceniono na 370–760 tys. dolarów. Obliczenia wykonano dla klasycznych metod fenotypowania, przy założeniu, że oznaczenie jednego antygeny wynosi 26 dolarów. Dla porównania, koszty związane z uniknięciem przeniesienia zakażenia HIV przez przetoczenie poprzez wprowadzenie badań molekularnych (HIV NAT), przeliczone na wskaźnik QALY (*quality-adjusted life year*, czyli liczba lat życia skorygowana jakością), wynoszą 2 miliony dolarów.

W kolejnym wykładzie sesji o metodach genotypowania grup krwi doktor Haer-Wigman i wsp. z laboratorium *Sanquin Blood Supply* w Holandii [6] przedstawiła wyniki badań dotyczące techniki MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). Opracowany zestaw odczynników (Blood-MLPA) pozwala oznaczyć 48 antygenów erytrocytów i 113 wariantów allelicznych z 18 układów grupowych, w tym *RHD*. Badania walidacyjne objęły 63 kolejnych dawców rasy kaukaskiej, 40 przypadkowych dawców narodowości chińskiej i 110 dawców o rzadkich fenotypach. Zestawiono ze

sobą 4038 wyników geno- i fenotypowania różnych antygenów. Równolegle badano 124 próbki technologią Luminex, z użyciem zestawu ID Core+ (Progenica). Autorzy stwierdzili, że 99,5% przewidywanych techniką MLPA fenotypów było całkowicie zgodnych z wynikami badań serologicznych. Wśród 20 odnotowanych rozbieżności: w 17 przypadkach błąd tkwił po stronie oznaczeń serologicznych, zaś w 3 leżał po stronie fałszywych wyników MLPA. Dwa z nich spowodowane były obecnością alleli typu null (*KEL\*02N06*; *KEL\*02N17*); w trzecim przypadku test MLPA nie wykrył nowego wariantu *GYPB*. Wyniki te wskazują, że MLPA, jako relatywnie prosty test, wnosi więcej informacji niż serotypowanie grup krwi i może być używany dla pacjentów podejrzanych o posiadanie rzadkich fenotypów/wariantów allelicznych antygenów. W konkluzji wykładu Haer-Wigman podkreśliła, że podobnie jak w badaniach antygenów HLA, gdzie genetyka zastąpiła badania serologiczne, na obecnym etapie metodyka ta może zastąpić badania serologiczne antygenów krwinek czerwonych.

Fichou Yann z Instytutu INSERM (*Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale*) z Berestu we Francji [7] omówił sekwencjonowanie nowej generacji (NGS). Podkreślił, że dla genotypowania grup krwi do celów transfuzjologii istotna jest wysoka przepustowość metody, objęcie genotypowaniem wszystkich wariantów o znaczeniu klinicznym oraz wysoka jakość otrzymywanych wyników. Wszystkie te wymagania spełnia sekwencjonowanie nowej generacji. Obecnie do wykonywania badań tą metodologią dostępne są cztery systemy: Ion Torrent™ Personal Genome Machine (PGM™), Illumina MiSeq Personal Sequencer, Roche GS Junior System (454 Sequencing System), Life Technologies Solid™ System. Autor przedstawił wyniki sekwencjonowania na aparacie PGM™ czterech kontrolnych próbek DNA o zdefiniowanych genotypach w 6 układach grupowych. Analizowano sekwencje 18 genów, zaangażowanych w ekspresję 15 układów grupowych (ABO, MNS, RH, LU, KEL, FY, JK, DI, YT, SC, DO, CO, LW, CROM, KN). Biblioteka starterów powieliła 417 amplikonów, które zlewano w 2 pule i poddawano emulsyjnemu PCR dla namnożenia jednorodnych sekwencji w mikroreaktorach tworzonych przez krople oleju. Następnie mieszaninę umieszczano w specjalnym mikrochipie i poddawano sekwencjonowaniu. Zsumowany rozmiar badanego regionu wynosił blisko 57 tysięcy par zasad. Stopień pokrycia odczytu sekwencji dla regionów kodujących wynosił 89,9%, a dla regionów 5' i 3' UTR (*untranslated region*) — 71,4%, przy czym 100% pokrycie osiągnięto dla sekwencji genu *KEL*, *DARC* (FY) i *ART4* (DO). Wyniki sekwencjonowania były zgodne z wynikami oznaczeń serologicznych dla wszystkich antygenów, oprócz antygenów z układu ABO. W ich analizie natrafiono na tak znaczne trudności, że zaniechano badania genu *ABO*. W konkluzji Fichou stwierdził, że po optymalizacji metodę tę będzie można stosować do badań różnych grup krwi poza układem ABO.

Kolejny prelegent — Stefan Meyer z Zurychu (*Blood Transfusion Service*) — omawiał wyniki szwajcarskiego Projektu *Blood Group Genotyping*, wykonywanego przy użyciu metody MALDI-TOF MS (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Mass Spectrometry*) [8]. Opiera się ona na analizie różnic w masie cząsteczkowej namnażanych produktów PCR przemienionych w jony i poddanych wędrowce w próżni (technologia spektrometrii masowej). Różnice we wzorach widm mas są widoczne już dla jednonukleotydowych różnic (tzw. SNP, *single nucleotide polymorphism*) w badanej sekwencji. Badania konstruuje się na zasadzie PCR typu multiplex, gdzie w jednej reakcji powiela się do 40 loci jednocześnie. Na wstępie wykładowca podkreślił, że strategia genotypowania antygenów u dawców jest odmienna od obecnie stosowanej do badań u chorych. W genotypowaniu dawców istotne jest to, aby objąć jak najwięcej układów grup krwi i badać dużą liczbę próbek jednocześnie. Ważna jest identyfikacja rzadkich grup krwi oraz rzadkich konstelacji antygenów. Prezentowany protokół MALDI-TOF MS obejmował 13 mutacji punktowych swoistych dla antygenów grup krwi (K/k, Jk<sup>a/b</sup>, Fy<sup>a/b</sup>/X/null, M/N, S/s, Kp<sup>a/b</sup>, Lu<sup>a/b</sup>, LU14/18, Yt<sup>a/b</sup>, Co<sup>a/b</sup> + płytkowe antygeny HPA-1<sup>a/b</sup>). Protokół pozwalał na przebadanie 3840 próbek DNA dziennie. Wykładowca oszacował, że w przypadku wdrażanego szerszego protokołu, obejmującego 107 SNP-ów dla „klinicznie istotnych” grup krwi (tzw. HemoCarta, poszerzona o warianty *RHD* i antygeny rzadkie), dzienna przepustowość badań będzie mniejsza i wyniesie 384 próbek DNA. Wykonane do tej pory badania standaryzacyjne w grupie 3100 krwiodawców potwierdziły wiarygodność metody MALDI-TOF MS. Nie stwierdzono rozbieżności wyników genotypowania z fenotypowaniem dla antygenów z układu Kel. Zanotowano po 3 rozbieżności dla układu Kidd oraz Duffy. Dwa błędy leżały po stronie nieprawidłowego fenotypowania, a jeden fałszywie dodatni wynik genetyczny spowodowany był wykryciem allelu typu null (*JK\*Bnull*; *FY\*Bnull*). W przyszłości program szwajcarski zakłada utworzenie dwóch oddzielnych platform do badań tą metodą — osobnej dla dawców i dla biorców.

94

Boccos z Francji (*Etablissement Francais du Sang Rhone-Alpes*) przedstawił w pełni zautomatyzowany system do rozszerzonego genotypowania grup krwi — HIFI Blood 96 — gdzie identyfikacja mutacji swoistych dla alleli kodujących antygeny erytrocytów oparta jest na technologii „biochipów” z wykorzystaniem specyficznych sond naniesionych w studzienkach płytki 96-dółkowej [9]. Dokonuje się na nich analizy multipleksowej reakcji PCR. Opracowano dwa panele dla genotypowania antygenów układów KEL, JK, FY, MNS i dla genotypowania DO, CO CR, LU, DI. Autorzy planują przebadać 5000 próbek i w 2013 roku otrzymać znak CE. Mają też w planie opracowanie testu dla *RHCE\*C*, *RHCE\*c*, *RHCE\*E*, *RHCE\*e* oraz osobnego panelu dla antygenów płytkowych HPA-1,2,3,4,5.

Duża liczba wykładów dotyczących wprowadzania metod molekularnych do badań w laboratoriach immunologii transfuzjologicznej świadczy o wielkim zainteresowaniu tą metodyką. Techniki molekularne mogą być stosowane, jako badania przesiewowe do identyfikacji krwiodawców „negatywnych” pod względem klinicznie istotnych antygenów, nie tylko przy pomocy testów komercyjnych ze znakiem IVD, lecz także metodami opracowanymi w danym laboratorium — tzw. *home made*. Ważna jest weryfikacja znalezionej ujemnego fenotypu drugą metodą (najlepiej serologiczną, jeśli jest to niemożliwe to inną metodą genetyczną). Każdy podjęty krok wykorzystywania metod

genotypowania antygenów grup krwi u dawców zwiększa bezpieczeństwo przetoczeń.

## Piśmiennictwo

1. Westhoff C.M. Molecular DNA-based testing for blood group antigens: recipient-donor focus. ISBT Science Series, 2013; 8: 1–5.
2. Peyrard T. Use of genomics for decision-making in transfusion medicine: laboratory practice. ISBT Science Series, 2013; 8: 11–15.
3. van der Schoot C.E., de Haas M. Prenatal screening. ISBT Science Series, 2013; 8: 6–10.
4. Watkins N. Blood group genotyping — SNPs to sequencing. Doniesienie 4A-S34-01 w programie 23 zjazdu ISBT; brak streszczenia w *Vox Sang.* 2013; 105 (supl. 1): 59.
5. Kacker S., Ness P.M., Savage W.J. i wsp. Cost-effectiveness of prospective red blood cell antigen matching to prevent alloimmunization among sickle cell patients. *Transfusion* 2013; doi: 10.1111/trf.12250.
6. Haer-Wigman L., Ji Y., Loden M., de Haas M., van der Schoot C.E., Veldhuisen B. Comprehensive genotyping for 18 blood group systems using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Vox Sang.* 2013; 105 (supl. 1): 59.
7. Fichou Y., Audrezet M.P., Gueguen P. i wsp. Next-Generation Sequencing (NSG) for blood group genotyping. *Vox Sang.* 2013; 105 (supl. 1): 59.
8. Meyer S., Vollmert C., Trost N., Buser A., Frey B.M., Gassner C. Validation of KEL (Kell), SLC14A1 (Kidd) and DARC (Duffy) MALDI-TOF MS high throughput blood group genotyping using >3.100 serologically pre-typed donor samples. *Vox Sang.* 2013; 105 (supl. 1): 60.
9. Boccos S.A., Bailly P., Bres J.C., Rigal D., Blum L.J., Marquette C.A. Validation of a fully automated platform for extended blood group genotyping. *Vox Sang.* 2013; 105 (supl. 1): 60.