

# Wybrane zagadnienia dotyczące badań antygenów krwinki czerwonej metodami biologii molekularnej

w świetle doniesień prezentowanych na XXXIII Światowym Zjeździe Międzynarodowego Towarzystwa Przetaczania Krwi w Seulu (Korea Południowa)

The latest news about blood antigen genotyping presented during the 33<sup>rd</sup> International Congress of the International Society of Blood Transfusion in Seul (South Korea)

Agnieszka Orzińska

Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

Jednym z wiodących tematów omawianych na ostatnich zjazdach Międzynarodowego Towarzystwa Przetaczania Krwi (ISBT, *International Society of Blood Transfusion*) jest wykorzystanie metod biologii molekularnej w laboratoriach immunoematologicznych jako narzędzia uzupełniającego bądź wiodącego w określaniu antygenów grup krwi u dawców lub biorców krwi. Na XXXIII światowym zjeździe w Seulu, w Korei Południowej, zastosowanie metod analizy kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA, *deoxyribonucleic acid*) w badaniach antygenów krwinek czerwonych i płytkowych omawiano na sesjach „Genotypowanie Grup Krwi” (*Blood Group Genotyping*), „Białka Błonowe Krwinki Czerwonej” (*Red Cell Membrane Proteins*), „Genotypowanie grup krwi: nowy przymierzeniec w laboratorium” (*Blood genotyping: a new ally in your lab*) i na sesji satelitarnej zorganizowanej przez firmę Grifols. Doniesienia o wykorzystywaniu metod genotypowania grup krwi były także licznie prezentowane w sesji plakatu w sekcji „Immunologia Krwinki Czerwonej” (*Red Cell Immunology: Molecular*).

Podczas zjazdu zaprezentowano doniesienia na temat wykorzystania różnych technologii do genotypowania grup krwi w ośrodkach badawczo-naukowych i laboratoriach immunologii transfuzjologicznej. W tych ostatnich metody molekularne są wykorzystywane głównie jako narzędzie do tworzenia rejestrów dawców krwi o oznaczonym rozszerzonym fenotypie. Niewątpliwymi zaletami metod analizy DNA są możliwość badań masowych o wysokiej powtarzalności i opłacalność ekonomiczna przy dużej skali testów, dzięki czemu można szybko i tanio identyfikować dawców o rzadkich grupach.

Rieneck i wsp. zaprezentowali w sesji plakatu wyniki genotypowania 20 000 dawców krwi pochodzących z duńskiej populacji badanych w celu znalezienia osób o rzadkich antygenach erytrocytarnych: Kpb, Yta, Vel-ujemny lub płytkowych: HPA-1a-ujemny. Wykryto czterech dawców Kpb-ujemnych, 35 dawców Yta-ujemnych, 478 HPA-1a-ujemnych oraz licznych Vel-ujemnych, a koszt detekcji (bez izolowania DNA) oszacowano na 14 centów amerykańskich za cechę dla jednej osoby.

**Adres do korespondencji:** dr n. biol. Agnieszka Orzińska, Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Chocimska 5, 00–975 Warszawa, tel.: 22 349 66 73, faks: 22 349 66 14, e-mail: orzinska@ihit.waw.pl

Punktem wyjścia wykładu dr Delaney (*Genotyping Blood Donors for Improved Transfusion Care*) była analiza własnych obserwacji dotyczących trudności w doborze krwi do przetoczeń u wielokrotnych biorców krwi. Spośród tych pacjentów 20–40% wytwarza przeciwciała — przede wszystkim do antygenów z układu Rh oraz Kell, ale także do innych antygenów. Zapewnienie tym chorym krwi do przetoczenia, szczególnie w sytuacjach pilnej transfuzji, jest dużym wyzwaniem. Dobór dawców krwi pod kątem zgodności w zakresie rozszerzonego fenotypu wymaga posiadania dużego rejestru dawców o oznaczonym rozszerzonym fenotypie. Prelegent podkreślił rolę metod analizy DNA w badaniach masowych związanych z tworzeniem takiego rejestru i zaprezentował wyniki własne badań 15 000 dawców, wśród których zidentyfikowano 55 posiadających antygeny zaliczane do antygenów rzadkich, a 1247 — niepowszechnych. Zaznaczył, że przy doborze metody i zakresu genotypowania należy kierować się lokalnymi potrzebami i uwarunkowaniami oraz opracować plan genotypowania dawców w odniesieniu do możliwości ekonomicznych danego ośrodka, szczególnie przy poszukiwaniu cech rzadkich, gdy badania dotyczą dużych liczebnie grup. Na zakończenie prelegent podkreślił, że z jednej strony obecnie wykorzystywane są w pełni skomputeryzowane platformy do genotypowania grup krwi o wysokiej przepustowości, z drugiej zaś uzupełnianie baz danych wciąż odbywa się ręcznie przez operatora, gdyż brakuje rozwiązań umożliwiających przepływ informacji między wykorzystywanymi platformami a systemami szpitalnymi czy laboratoryjnymi. Wskazał także na fakt, że w dobie zaawansowanych technologii wykorzystywanych do oznaczenia rozszerzonego genotypu grup krwi, sposób znakowania i opisywania jednostek krwi wymaga unowocześnienia.

Obok powszechnie stosowanych protokołów typu *home-made*, opartych na klasycznych metodach biologii molekularnej, oraz zaawansowanych technologii i testów ze znakiem dyrektywy dla wyrobów medycznych do diagnostyki *in-vitro* (IVD, *in vitro diagnostic device directive*) do typowania antygenów grup krwi, następuje szybka implementacja najnowszej technologii sekwencjonowania następnej generacji (NGS, *next generation sequencing*) do badań polimorfizmów, które stanowią podłoże swoistości antygenowych. Profesor Avent zaprezentował wstępne wyniki badań genotypowania grup krwi przy użyciu tej technologii na platformie urządzenia *Ion Torrent™ Personal Genome Machine* (*Next generation sequencing: academic overkill or high-resolution blood group*

*genotyping?*) [1]. Badacze opracowali kolejne etapy sekwencjonowania antygenów z układów Rh, Duffy i Kidd: przygotowanie biblioteki przez amplifikację całkowitej sekwencji genomowej alleli kodujących swoistości antygenowe z zastosowaniem reakcji łańcuchowej polimerazy o dużym zasięgu (*long-range PCR, long-range polymerase chain reaction*), ich fragmentację i ligację z oligonukleotydami adaptorowymi, zawierającymi sekwencje kodu z identyfikatorem, aż po sekwencjonowanie mieszaniny 70 próbek na raz. Wyniki dla genów *RHD*/*RHCE* pokrywały się z wynikami serologicznymi tylko dla osób heterozygotycznych pod względem antygeny D, a w pozostałych przypadkach, ze względu na wysoką homologię sekwencji genów *RHD* i *RHCE* oraz występowanie genów hybrydowych *RHD-CE-D*, problem stanowiło dopasowanie, z którego chromosomu pochodzi badany fragment. Tu badacze wskazali na konieczność stosowania długich amplikonów i rozdzielenia badań genów *RHD* i *RHCE*. W podsumowaniu wykładowca podkreślił, że technika NGS, początkowo stosowana tylko w ośrodkach badawczo-naukowych, obecnie (dzięki temu, że koszt NGS spadł znacznie w ciągu ostatnich 5 lat) staje się coraz szerzej dostępna dla małych laboratoriów diagnostycznych. Zastosowanie jej umożliwia posiadanie pełnej sekwencji DNA dawcy lub pacjenta i jej szybkie dopasowanie do fenotypu przez porównanie do danych w coraz bogatszych i pełniejszych bazach genetycznych dotyczących antygenów grup krwi. Należy przypuszczać, że w najbliższym czasie nastąpi uproszczenie obróbki bioinformatycznej surowych wyników przez powstanie prostych programów do przeszukiwania baz i do tworzenia raportów z genotypowania antygenów grup krwi.

Dodatkowe informacje techniczne dotyczące wykorzystania NGS zaprezentowano także w doniesieniu plakatowym (Altayar i wsp. [2]). Pełne zsekwencjonowanie alleli kodujących antygeny z układu Duffy wykazało obecność dwóch dodatkowych miejsc polimorficznych w eksonie drugim (obok kodujących antygen Fya i Fyb) i czterech we fragmentach intronowych genu. Podobny obraz występowania trzech polimorfizmów w eksonach i licznych — 132 zmian pojedynczego nukleotydu (SNP, *single nucleotide polymorphism*) lub insercja/delecja we fragmentach intronowych wykazano dla alleli kodujących antygeny z układu Kidd w 32 przebadanych próbkach. Określono wzory mutacji intronowych dla poszczególnych genotypów: osiem wzorów dla *JK\*A- / JK\*B+*, dwa dla *JK\*A+ / JK\*B-* i dwa dla *JK\*A+ / JK\*B+*. Nie zaprezentowano wyników sekwencjonowania antygenów

z grup głównych AB0, dla którego protokół nadal wymaga dopracowania.

Metody molekularne znajdują szerokie zastosowanie jako narzędzie weryfikacji oznaczeń serologicznych, szczególnie w identyfikacji antygenów o osłabionej ekspresji. W wykładzie pod tytułem *Kidd antigen discrepancies: genotype-predicted phenotype vs serologic phenotype* profesor Keller z Amerykańskiego Czerwonego Krzyża (*American Red Cross*) podsumował wyniki badań genotypu antygenów z układu Kidd techniką *HEA BeadChip* u ponad 60 000 dawców z oznaczonym fenotypem Jk [3]. Badacze wykryli siedem niezgodności między genotypem i przewidywanym fenotypem a oznaczeniami serologicznymi — dwa pod względem określenia obecności antygeny Jka i pięć dotyczących antygeny Jkb. Dalsze badania technikami: analizy długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP-PCR, *restriction fragment length polymorphism-polymerase chain reaction*), allelospecyficznej reakcji łańcuchowej polimerazy (SSP-PCR, *single strand conformation polymorphism-polymerase chain reaction*) oraz sekwencjonowania wykazały, że w pięciu przypadkach rozbieżnych wyników wykryto allele *JK\*null* odpowiedzialne za brak ekspresji antygeny Jkb. Analiza rozbieżności wyników genotypowania antygeny Jka w jednym przypadku wykazała obecność allelu *JK\*01W.01* związanego z powstawaniem fenotypu Jk(a+) o osłabionej ekspresji dającego fałszywie ujemny wynik fenotypowania. W drugim przypadku metodą sekwencjonowania wykryto nowy wariant allelu *JK\*A*, dający fałszywie negatywny wynik genotypowania. W podsumowaniu badacze podkreślili, że rozbieżności wyników genotypowania allelu *JK* otrzymane techniką *HEA BeadChip* i fenotypowania antygenów Jka i Jkb są bardzo rzadkie (7/60 000), co dowodzi wysokiej wiarygodności stosowania metod molekularnych w determinacji antygenów z tego układu. Podobnie profesor Avent i wsp. przy użyciu technologii NGS stwierdzili znacznie wyższą częstość występowania (od opisywanej w literaturze) allelu *JK\*A weak* kodującego warianty antygeny Jk(a) o osłabionej ekspresji. Metodami serologicznymi takie warianty są określane jako Jk(a-).

Profesor Hyland z Australijskiego Czerwonego Krzyża (*Australian Red Cross*) przeprowadziła analizę rozbieżności wyników genotypowania a fenotypowania dla antygenów z układu Duffy [4]. Wśród 256 badanych przypadków badacze wykryli 5% oznaczeń serologicznych fałszywie ujemnych dla antygeny Fyb, podczas gdy techniką wysokiej rozdzielczości topnienia (HRM-PCR, *high-resolution melting*) lub z użyciem platformy *BLOODChip*

wykazano obecność allelu *FY\*02W.01* kodującego antygen Fyb<sup>w</sup> o osłabionej ekspresji. W trzech przypadkach jako przyczynę wyniku fałszywie *FY\*A*-dodatniego ustalono obecność wariantów nieulegających ekspresji, a w jednym stwierdzono obecność wariantu allelu *FY\*A* kodującego antygen Fya+ o osłabionej ekspresji nie wykrywany rutynowo stosowanymi testami serologicznymi. Badacze podkreślili dużą częstość występowania rozbieżności między technikami genotypowania a fenotypowania i potrzebę opracowania algorytmu włączenia badań genotypu antygeny Fya/Fyb jako koniecznego uzupełnienia oznaczeń serologicznych.

W sesji plakatowej także zaprezentowano szereg doniesień o wykryciu nowych alleli kodujących warianty wyrażające się osłabionym fenotypem lub nieulegające ekspresji, które wykryto metodami analizy DNA.

W swoim doniesieniu de Haas i wsp. opisali podłoże genetyczne wariantów fenotypu Kell spotykanych w populacji holenderskiej [5]. Wśród 407 przebadanych dawców *KEL:1,-2* u 7,4% wykryto rozbieżności wyniku genotypowania i oznaczeń serologicznych, u 4% zidentyfikowano *KEL\*02.mod*, a u 2,7% — *KEL\*02null*, w tym siedem nowych wariantów nieulegających ekspresji. Henny i wsp. opisali wykrycie 3 nowych alleli *JK* wśród dawców szwajcarskich [6]. Badania prowadzono techniką SSP-PCR typu *home-made* opracowaną do wykrywania 22 alleli kodujących antygeny grup krwi. Badacze uzyskali 15 rozbieżności genotypu względem oznaczeń serologicznych w układzie Kidd — w czterech przypadkach stwierdzono błąd w fenotypowaniu, a w pięciu techniką sekwencjonowania wykryto 3 nowe warianty: *JK\*01(del516-530)*, *JK\*02.810G>A*, dające brak ekspresji antygenów, i jeden *JK\*02.988A.1095C* o obniżonej ekspresji antygeny Jkb.

Westhoff i wsp. zaprezentowali doniesienie *Identification of two new alleles in the FY system associated with silencing of antigen expression*, w którym opisali wykrycie nowych alleli *FY\*02.895G>A* oraz *FY\*02.(del179-180)* u dawców z rozbieżnymi wynikami fenotypowania i genotypowania techniką *HEA BeadChip* [7].

Vrignaud i wsp. zaprezentowali wykrycie 11 nowych polimorfizmów typu SNP w genie *RHCE* kodujących antygeny C, E lub e z układu Rh o osłabionej ekspresji [8].

Metody analizy DNA stosuje się w przypadku braku lub ograniczonego dostępu do odczynników diagnostycznych, takich jak surowice z przeciwciałami anti-Vel czy anti-MAR-like. W sesji

„Białka błonowe krwinki czerwonej” naukowcy z Uniwersytetu Lund w Szwecji (Christophersen i wsp.) przedstawili analizę molekularnych podstaw zmienności poziomu ekspresji tego antygeny u osób Vel-dodatnich [9]. W zeszłym roku badacze opisali wykrycie u osób o fenotypie Vel-ujemnym delecji 17 nukleotydów w genie *SMIM1*. Przy użyciu metod biologii molekularnej, takich jak sekwencjonowanie, reakcja łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR, *real-time polymerase chain reaction*) oraz cytometria przepływowa z ludzkimi przeciwciałami anti-Vel badacze zidentyfikowali w intronie drugiego genu dwa polimorfizmy jednonukleotydowe, których obecność jest mocno skorelowana z poziomem ekspresji antygeny Vel. U homozygot noszących allel „minor” wraz ze sprzężonymi z nim dwoma polimorfizmami obserwowano wysoką ekspresję *SMIM1* zarówno na poziomie wykrywanego matrycowego kwasu rybonukleinowego (mRNA, *messenger ribonucleic acid*) białka, jak i samego antygeny Vel w błonie komórek. W drugim doniesieniu badacze holenderscy (van der Schoot i wsp.) opisali walidację testu genetycznego do wykrywania dawców o rzadkim fenotypie Vel-ujemnym [10]. Ze względu na różny poziom ekspresji antygeny Vel i brak odczynników do powszechnych badań serologicznych autorzy opracowali test do badań o wysokiej skali przepustowości wykrywający allel *SMIM1\*64\_80del*, występujący u osób Vel-ujemnych. Określili częstość występowania tego allelu na 1,46% wśród rasy białej, 0,56% — negroidalnej i 0,60% — żółtej.

Genotypowanie grup krwi jest też przydatne w doborze panelu dawców do identyfikacji przeciwciał. W sesji plakatowej zaprezentowano doniesienie o opracowaniu metody screeningu genetycznego antygeny C<sup>w</sup> z układu Rh w celu wytypowania dawców panelowych do badań. Technika SSP-PCR badacze (Crottet i wsp.) przebadali 747 dawców, określonych jako C<sup>w</sup>-dodatni, i wykryli 7 dawców C<sup>w</sup> homozygotycznych, o rzadkim fenotypie Mar-ujemnym, z których jeden został cennym dawcą panelowym dla centrum krwiodawstwa [11].

Jedną z ostatnio coraz szerzej stosowanych aplikacji jest wykorzystanie badań genotypowania do oznaczania antygenów u pacjentów w celu podwyższenia skuteczności i bezpieczeństwa transfuzji. W doniesieniu plakatowym Belsito i wsp. przebadali 225 dawców i 50 pacjentów zależnych od transfuzji, wykorzystując do genotypowania platformę *HEA BeadChip*, a do fenotypowania analizator *NEO Immucor (Erythrocyte genotyping: our experience at second university of Naples)* [12]. Wyniki oznaczenia antygenów RhC, E i Kell obie-

ma metodami wykazały jeden wynik rozbieżny w grupie dawców i aż 27/50 w grupie pacjentów. W związku z tym autorzy podkreślili fakt konieczności genotypowania antygenów krwinki czerwonej u biorców zależnych od transfuzji. Zaznaczyli, że takie postępowanie pozwoli na weryfikację i poszerzenie oznaczeń serologicznych u pacjentów i prawidłowe dobranie dawców, a przez to zapobiegnie alloimmunizacji biorcy oraz wpłynie na skrócenie czasu i obniżenie kosztów związanych z kolejnym doбором.

Podsumowując, można zauważyć jak ogromne zainteresowanie metodami genotypowania antygenów krwinki czerwonej i wzrastająca dostępność platform oraz technologii do badań o wysokiej przepustowości przekłada się na wzrost wiedzy na temat bogactwa podłoża molekularnego różnych swoistości antygenowych. To przekłada się na bardzo szybką rozbudowę baz genetycznych z pełnymi sekwencjami nowych alleli, zarówno nieulegających wyrażaniu, jak i o obniżonej ekspresji. Gromadzone obecnie w laboratoriach całego świata dane genetyczne posłużą w przyszłości do utworzenia programów porównujących wykrytą sekwencję z badaną, poprawnego przewidywania fenotypu pacjenta, a także doboru krwi od dawcy o identycznym genotypie. Obecnie analiza DNA do badań antygenów krwinek koncentruje się przede wszystkim na typowaniu wielokrotnych dawców krwi w celu wynajdywania osób z rzadkimi antygenami lub genotypami występującymi z niską częstością, ale także w coraz większym stopniu badania stają się powszechne w odniesieniu do pacjentów wymagających wielokrotnych transfuzji. Dodatkowo przeprowadzone badania całych sekwencji genów dostarczają informacji o występowaniu wzorów mutacji polimorficznych w innych regionach alleli kodujących antygeny grup krwi, a znaczenie wykrywanych sprzężeń w odniesieniu do zjawisk immunologicznych staje się kolejnym wyzwaniem dla badaczy.

## Piśmiennictwo

1. Avent N.D., Madgett T.E., Halawani A.J., Altayar M.A., Kiernan M., Reynolds T.J. Next generation sequencing: academic overkill or high-resolution blood group genotyping? *Vox Sang.* 2014; 107 (supl. 1): 37.
2. Altayar M.A., Halawani A.J., Kiernan M. i wsp. Extensive genotyping of blood groups Duffy Kidd and AB0 by next generation sequencing. *Vox Sang.* 2014; 107 (supl. 1): 187.
3. Keller M.A., Crowley J.A., Horn T. Kidd antigen discrepancies: genotype-predicted phenotype vs serologic phenotype. *Vox Sang.* 2014; 107 (supl. 1): 37.
4. Hyland C.A., Lopez G., McBean R., Liew Y.W., Condon J., Flower R.L. Duffy blood group typing: is genotyping more accurate

- than phenotype for Duffy Blood grouping? *Vox Sang.* 2014; 107 (supl. 1): 37.
5. de Haas M., Ji Y., Ligthart P. i wsp. Novel alleles at the Kell blood group locus that lead to Kell variant phenotype. *Vox Sang.* 2014; 107 (supl. 1): 190.
  6. Henny C., Lejon Crottet S., Gowland P.L., Niederhauser C., Hustinx H. Three novel JK alleles detected in Swiss blood donors. *Vox Sang.* 2014; 107 (supl. 1): 188.
  7. Westhoff C.M., Vege S., Lomas-Francis C., Hue-Roye K., Patel P., Velliquette R. Identification of two new alleles FY\*B C.895G>A and FY\*B C.179\_180delCT, in the FY system associated with silencing of antigen expression. *Vox Sang.* 2014; 107 (supl. 1): 195.
  8. Vrignaud C., Ramelet S., Pecquet F. i wsp. Characterization of 11 novel *RHCE* alleles in French blood donors. *Vox Sang.* 2014; 107 (supl. 1): 187.
  9. Christophersen M.K., Jöud M., Thuresson B. i wsp. Genetic variants regulate expression of SMIM1 and the Vel blood group antigen. *Vox Sang.* 2014; 107 (supl. 1): 16.
  10. van der Schoot C.E., Ait Soussan A., Beckers E. i wsp. Genetic screening for the Vel-phenotype circumvents difficult serological screening due to variable Vel expression levels. *Vox Sang.* 2014; 107 (supl. 1): 16.
  11. Lejon Crottet L., Henny C., Tinguely C., Niederhauser C., Mürger E., Hustinx H. Serological screening and molecular characterization of the Cw antigen (RH8) in Swiss blood donors. *Vox Sang.* 2014; 107 (supl. 1): 172.
  12. Belsito A., Costa D., Fiorito C. De Iorio G., Grimaldi V., Napoli C. Erythrocyte genotyping with HEA Bead Chip Kit: our experience at Azienda Ospedaliera Universitaria, Second university of Naples. *Vox Sang.* 2014; 107 (supl. 1): 194.