


# Aktualny stan zastosowań metod molekularnych do badań antygenów komórek krwi w badaniach konsultacyjnych prowadzonych przez laboratoria referencyjne

Katarzyna Guz<sup>1</sup>, Agnieszka Orzińska<sup>1</sup>, Bogumiła Michalewska<sup>1</sup>,  
 Monika Pelc-Kłopotowska<sup>1</sup>, Ewa Brojer<sup>1</sup>, Magdalena Łętowska<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

<sup>2</sup>Zakład Transfuzjologii Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

Artykuł jest tłumaczeniem pracy:

Guz K, Orzińska A, Michalewska B et al. Molecular biology methods for blood cell antigens genotyping in reference laboratories. J Transf Med 2019; 12 (4): 199–205. DOI: 10.5603/JTM.2019.0010.

Należy cytować wersję pierwotną.

## Streszczenie

*Celem opracowania jest przedstawienie aktualnych zastosowań metod biologii molekularnej w badaniach konsultacyjnych z zakresu immunohematologii i stanu ich wdrożenia w polskiej publicznej służbie krwi. Badania molekularne są wykorzystywane w poszukiwaniu przyczyn różnorodności oznaczeń serologicznych uzyskiwanych w laboratoriach immunohematologicznych, które prowadzą badania rutynowe, w tym do identyfikacji dawców z antygenem RhD o słabej ekspresji, niewykrywalnym metodami serologicznymi, oraz identyfikacji biorców ze słabym antygenem D, niepodatnych na alloimmunizację. Metody te są też stosowane w nieinwazyjnych badaniach genów płodu u uodpornionych kobiet z konfliktem serologicznym oraz u kobiet RhD-ujemnych w celu kwalifikacji do śródciążowego podania immunoglobuliny anti-D. Istotna jest rola badań molekularnych w oznaczaniu antygenów krwinek czerwonych u pacjentów z alloprzeciwciałami odpornościowymi do antygenów powszechnie występujących, u pacjentów z alloprzeciwciałami do antygenów płytek i granulocytów, a także przy poszukiwaniach dawców „antygenowo ujemnych” dla tych pacjentów. Wszystkie te badania są dostępne i stosowane w Polsce.*

**Słowa kluczowe:** metody molekularne genotypowania, antygeny grup krwi, antygeny płytek krwi (HPA), antygeny granulocytów (HNA), badania immunohematologiczne

*J. Transf. Med.* 2019; 12: 191–198

## Wstęp

Badania molekularne antygenów komórek krwi rozwijają się intensywnie od momentu opublikowania na przełomie lat 1989/1990 pierwszych doniesień o poznaniu sekwencji DNA genów kodujących najistotniejsze klinicznie antygeny komórek krwi,

a od połowy lat 90. minionego wieku są sukcesywnie wprowadzane do diagnostyki [1–4]. Początkowo wykorzystywano je w badaniach antygenów płytek i granulocytów, w których zetknięto się z wieloma ograniczeniami metod serologicznych [4–8].

Od początku 2000 roku badania molekularne objęły też antygeny erytrocytów, co było możliwe

**Adres do korespondencji:** dr n. biol. Katarzyna Guz, Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej IHIT, ul. Chocimska 5, 00–791 Warszawa, e-mail: kguz@ihit.waw.pl

dzięki poznaniu podłoża genetycznego układów grupowych [9–11].

### Aktualny stan zastosowań metod molekularnych w laboratoriach referencyjnych na świecie i w Polsce

Obecnie metody molekularne są stosowane na świecie i w Polsce przede wszystkim w referencyjnych i wysoko specjalistycznych laboratoriach immunohematologicznych [9–14].

Badania te wykonywane są przy użyciu metod opartych na technice reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*). Najwcześniej opracowane testy polegają na amplifikacji ze starterami specyficznymi dla alleli (PCR-SSP, *polymerase chain reaction with sequence specific primers*) i analizie wzoru produktów PCR w żelu agarozowym albo na analizie elektroforetycznej fragmentów restrykcyjnych po poddaniu produktów PCR trawieniu enzymami restrykcyjnymi dobranymi do rozróżniania alleli (PCR-RFLP, *polymerase chain reaction restriction — fragment length polymorphism*). Nowszą modyfikacją tej techniki jest PCR, w której stosuje się fluorescencyjne barwienia produktu amplifikacji, czyli tzw. PCR w czasie rzeczywistym (*real-time PCR*) z sondami swoistymi dla alleli typu TaqMan lub HybProbe albo z barwnikami interkalującymi do DNA typu SYBR Green. Stosowane są też metody *real-time PCR* oparte na analizie krzywej topnienia produktu amplifikacji (HRM, *high resolution melting*) (tab. 1) [12–14]. W krwiodawstwie holenderskim wykorzystywana jest technika opierająca się na amplifikacji zależnej od ligacji sond (MLPA, *multiplex ligation-dependent probe amplification*) [15]. Coraz więcej ośrodków stosuje też technologie przeznaczone do większej skali badań, m.in. oparte na mikromacierzach, spektrometrii masowej, cyfrowym PCR. Opracowywane są również badania wykorzystujące technologie sekwencjonowania nowej generacji (NGS, *next generation sequencing*). Te zagadnienia zostały szczegółowo opisane przez autorki w odrębnych publikacjach z tego roku [16, 17].

Do badań stosuje się testy opracowywane w laboratoriach (tzw. *home made*) lub — jeśli są dostępne na rynku — wystandaryzowane testy komercyjne ze znakiem IVD (*in vitro diagnostics*). Ich zestawienie znajduje się w tabeli 2 i w publikacji Guz i wsp. 2019 [16].

W przypadkach, gdy zastosowane metody nie pozwalają na uzyskanie jednoznacznych odpowiedzi co do podłoża molekularnego antygeny, konieczne jest przeprowadzenie badań dodatkowych, opartych

**Tabela 1.** Metody o niskiej i średniej przepustowości stosowane do genotypowania grup krwi w laboratoriach referencyjnych na świecie

<b>PCR z rozdziałem elektroforetycznym w żelu agarozowym</b>
PCR-RFLP
PCR-SSP: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>home made mono/multiplex</i></li> <li>• komercyjne (Inno-Train, BAG Diagnostics)</li> </ul>
<b>Real-time PCR</b>
TaqMan ( <i>home made</i> ; FluGene Inno-Train) <ul style="list-style-type: none"> <li>• HybProbes</li> <li>• HRM</li> </ul>
<b>Elektroforeza kapilarna</b>
MLPA

Objaśnienia skrótych nazw metod znajdują się w tekście.

przede wszystkim na technice sekwencjonowania genu kodującego dany antygen. Wykonuje się je na ogół przy użyciu klasycznej metody Sangera, ale takie analizy mogą być prowadzone też przy wykorzystaniu NGS [17].

Wymienione w tabeli 2 testy komercyjne IVD stosowane do badań konsultacyjnych w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii są testami o tzw. małej przepustowości — umożliwiają wykonywanie badań w pojedynczych próbkach. Opracowywane w Instytucie protokoły testów *home made* techniką *real-time PCR*, przy zautomatyzowaniu izolacji DNA i procesu przygotowywania mieszanin do reakcji PCR, mogą osiągnąć tzw. średnią przepustowość. Zależy ona od wielkości posiadanego bloku grzejnego w aparacie do *real-time PCR* i zwykle pozwala na analizę 96–384 próbek równolegle przy badaniu jednego polimorfizmu. Do prowadzenia (tych testów) konieczne jest zastosowanie automatów do izolacji DNA oraz stacji pipetującej.

Badania molekularne prowadzone aktualnie przez laboratorium referencyjne w Instytucie są analogiczne do tych wykonywanych w laboratoriach immunohematologicznych na świecie i koncentrują się na:

1. poszukiwaniu przyczyn rozbieżności oznaczeń serologicznych uzyskiwanych w laboratoriach immunohematologicznych prowadzących badania rutynowe, a także w przypadkach, gdy laboratoria te napotykały trudności w określeniu grupy krwi AB0 i RhD lub w doborze krwi do przetoczenia;
2. identyfikacji dawców z antygenem RhD o słabej ekspresji, niewykrywalnym metodami serologicznymi;

**Tabela 2.** Obecnie dostępne w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii testy do badań antygenów erytrocytów, płytek i granulocytów

<p><b>Testy komercyjne IVD (PCR-SSP: RBC Ready Gene z analizą na żelu lub RBC FluoGene z analizą real-time PCR; Inno-Train)</b></p> <p>Grupy krwi: Rh (CDE, D weak/DEL, D neg), KKD (K/k, Jk<sup>a/b</sup>, Fy<sup>a/b</sup>, Fy<sup>null</sup> (-67C), FY*X), MNS (M/N, S/s, Vw, Mg), Rare (Kp<sup>a/b</sup>, Lu<sup>a/b</sup>, Di<sup>a/b</sup>, Wr<sup>a/b</sup>, Yt<sup>a/b</sup>, Co<sup>a/b</sup>, Kn<sup>a/b</sup>, Do<sup>a/b</sup>), ABO (01, 02, A, A2, B)</p> <p>Ocena zygotywności <i>RHD</i> ojców Rh+ w konflikcie Rh</p> <p>HPA-1, -2, -3, -4, -5, -6, -9, -15</p> <p>HNA-1, -3, -4, -5</p>
<p><b>Testy home made real-time PCR (sondy TaqMan)</b></p> <p>Analiza <i>end point</i>: RhE/e, K/k, M/N, S/s, Jk<sup>a/b</sup>, Fy<sup>a/b</sup>, Fy<sup>null</sup> (-67C), FY*X, Kp<sup>a/b</sup>, Wr<sup>a/b</sup>, Di<sup>a/b</sup>, Kn<sup>a/b</sup>, Yt<sup>a/b</sup>, Co<sup>a/b</sup>, Lu<sup>a/b</sup>, Lu8/14, Lw<sup>a/b</sup>, P1/P2, SC:1/2, Vel(-), LAN(-), Jr<sup>a</sup>(-) oraz HPA-1, -2, -3, -5, -15 i HNA-3, -4, -5:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• genotypowanie pacjentów, dawców</li> <li>• oznaczanie statusu płodu z materiału inwazyjnie pobranego</li> </ul>
<p><b>Analiza real-time:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• nieinwazyjne RhD, RhC, Rhc, RhE, K, HPA-1a płodu z osocza matki</li> <li>• identyfikowanie typu 1, 2, 3 biorców o fenotypie słabe D</li> <li>• poszukiwanie dawców <i>RHD</i>+ (D słaby, DEL) wśród dawców Rh-ujemnych</li> </ul>

Objaśnienia skrótych nazw metod znajdują się w tekście.

- identyfikacji słabej odmiany antygeny D typu 1, 2 lub 3 u biorców i kobiet w ciąży niepodatnych na alloimmunizację antygenem D;
- nieinwazyjnych badaniach genów płodu u kobiet z konfliktem serologicznym;
- nieinwazyjnych badaniach RhD płodu u kobiet RhD-ujemnych w celu kwalifikacji kobiet, których płód jest RhD-dodatni, do śródcieżowego podawania immunoglobuliny anti-D;
- genotypowaniu antygenów krwinek czerwonych w celu poszukiwania dawców „antygenowo-ujemnych” dla pacjentów z alloprzeciwciałami odpornościowymi do antygenów powszechnych;
- genotypowaniu antygenów HPA i HNA w diagnostyce alloimmunizacji tymi antygenami oraz w celu tworzenia rejestru dawców z oznaczonymi antygenami HPA i HNA dla pacjentów zimmunizowanych.

W dalszej części artykułu omówiono sytuacje, w których takie badania genetyczne są wykonywane.

### **1. Poszukiwanie przyczyn rozbieżności oznaczeń serologicznych, trudności w oznaczaniu grupy krwi AB0 i RhD oraz doborze krwi do przetoczenia**

Te zagadnienia szczegółowo opisano w punktach 1, 2 i 3 w tabeli 3. Badania molekularne są zawsze poprzedzone wykonaniem badań serologicznych w laboratorium referencyjnym Instytutu. Na ich podstawie ustala się zakres i metody badań mo-

lekularnych w Pracowni Genetyki Komórek Krwi, stosując różne testy wymienione w tabeli 2 [18–20].

### **2. Identyfikacja dawców z antygenem RhD o słabej ekspresji, niewykrywalnym metodami serologicznymi**

Z piśmiennictwa wiadomo, że krew dawców serologicznie RhD-ujemnych ze słabą ekspresją antygeny D może być immunogenna i powodować wytworzenie u biorcy alloprzeciwciał odpornościowych [21, 22]. W Instytucie opracowano system badań umożliwiających identyfikację takich dawców [23, 24]. Opiera się on na wykrywaniu genu *RHD* w DNA izolowanym z puli próbek osocza od dawców serologicznie RhD-ujemnych. W przypadku wykrycia genu w puli DNA pochodzącej od wielu dawców przeprowadza się kolejne badania w tzw. *cross* pulach lub w pojedynczych próbkach, po to by zidentyfikować dawcę z genem *RHD*. W kolejnych badaniach molekularnych i serologicznych należy określić, czy u dawcy dochodzi do ekspresji genu *RHD*, czyli czy antygen D jest wykrywany bardziej czułymi metodami od rutynowo stosowanych metod serologicznych, w tym przede wszystkim metodą adsorpcji/elucji [23, 24]. Wykonywanie oznaczenia ze zlanych w pule pojedynczych próbek osocza, pochodzących od wielu dawców znacząco obniża koszty izolacji DNA i przez to identyfikacji dawców z immunogennym antygenem D. Szacowany koszt to około 50 zł za zbadanie jednego dawcy, przy założeniu, że będzie się badać pule składające się z próbek osocza 48 dawców RhD-ujemnych. Badania takie

**Tabela 3.** Przydatność stosowania metod biologii molekularnej w immunohematologii komórek krwi

1. Wnioskowanie o fenotypie: <ul style="list-style-type: none"> <li>• u pacjentów po wielokrotnych przetoczeniach: dwie populacje krwinek czerwonych do 3 miesięcy po przetoczeniu</li> <li>• gdy krwinki są opłaszczane autoprzeciwciałami IgG (dodatni bezpośredni test antyglobulinowy — BTA)</li> <li>• przy podejrzeniu immunizacji antygenami powszechnie lub rzadko występującymi</li> <li>• gdy brak surowic diagnostycznych (m.in. przeciwciał anty-VS, -Yt<sup>b</sup>; -Js<sup>a</sup>, -Vel, -Co<sup>a</sup>)</li> </ul>
2. Pomoc w identyfikacji alloprzeciwciał odpornościowych: <ul style="list-style-type: none"> <li>• określenie obecności/braku korespondującego antygeny do podejrzewanej swoistości przeciwciał w przypadku niejednoznacznych wyników serologicznych</li> <li>• pomoc w rozróżnianiu alloprzeciwciał od autoprzeciwciał przez określenie genotypu/fenotypu pacjenta i jednocześnie wskazanie fenotypu krwinek wzorcowych koniecznych do przeprowadzenia badania do alloadsorpcji</li> </ul>
3. Poszukiwanie przyczyn rozbieżności oznaczeń serologicznych — identyfikacja wariantów: <ul style="list-style-type: none"> <li>• genu <i>RHD</i> z nietypową ekspresją antygeny D: D słabe, D częściowe, Del u osób Rh-ujemnych</li> <li>• genu <i>RHCE</i> z nietypową ekspresją antygenów C/c i/lub e/E</li> <li>• genu <i>ABO</i></li> <li>• genu <i>ACKR1/DARC</i>: fenotyp FY<sup>null</sup> (-67C), antygen Fy<sup>b</sup> słaby (FY*X)</li> </ul>
4. Nieinwazyjne badania genotypu grup krwi/HPA płodu z krwi matki: <ul style="list-style-type: none"> <li>• u kobiet z przeciwciałami odpornościowymi (anty-D, -C, -G, c, -E, -K, HPA-1a)</li> <li>• u kobiet RhD-ujemnych bez przeciwciał w celu kwalifikacji do śródciażowej immunoprofilaktyki</li> </ul>
5. Tworzenie rejestrów dawców do przetoczeń oraz pozyskiwania paneli krwinek wzorcowych do identyfikacji przeciwciał: <ul style="list-style-type: none"> <li>• poszukiwanie homozygot w antygenach C/c, E/e, K, Fya/b, Jka/b, MNS (różnych kombinacji)</li> <li>• poszukiwanie ujemnych fenotypów bez antygenów powszechnych (HFA): m.in. k-, Kp(b-), Js(b-), Lu(b-), Di(b-), Yt(a-), Co(a-), Jr(a-), Lan(-), Vel(-)</li> <li>• genotypowanie antygenów rzadkich (LFA): m.in. VS+, Js(a+), Kp(a+), Di(a+), Wr(a+)</li> <li>• genotypowanie antygenów HPA i HNA, szczególnie dla poszukiwania homozygot HPA-1b/b i HPA-5a/a służących do leczenia przetoczeniami KKP płodów/novorodków z alloimmunologiczną małopłytkowością (AIMPN)</li> </ul>

są obecnie wykonywane w niektórych krajach europejskich (m.in. Niemcy, Austria, Szwajcaria), choć w tych państwach stosuje się strategię pulowania DNA izolowanego z pełnej krwi [25, 26]. Uzasadnieniem dla tej rekomendacji są opisane w literaturze obserwacje, że do wywołania odpowiedzi immunologicznej u biorcy wystarcza 30 cząsteczek antygeny D. Możliwe jest zatem wywołanie produkcji przeciwciał anty-D u pacjenta w wyniku przetoczenia mu koncentratu krwinek czerwonych (KKCz) od dawcy ze słabą ekspresją antygeny D. Do alloimmunizacji może dojść nawet po przetoczeniu krwi od dawcy z antygenem typu DEL wykrywanym jedynie metodą adsorpcji/elucji, której nie stosuje się u dawców rutynowo [22].

W przeprowadzonym w Instytucie programie finansowanym ze środków Narodowego Centrum Nauki (NCN) wykazano, że potencjalnie immunogeny antygen D wykrywa się u około 0,09% dawców określonych w badaniach rutynowych jako RhD-ujemni. Wszyscy zidentyfikowani dawcy mieli fenotyp C+ i/lub E+ [23]. W celu zwiększenia bezpieczeństwa pacjentów RhD-ujemnych dawcy określani jako RhD-ujemni C+ i/lub E+ powinni

być badani genetycznie, a dawcy z wykrytym wariantem genu *RHD* ulegającym ekspresji powinni zostać zakwalifikowani do grupy dawców RhD-dodatnich. Metodyka takich badań została opracowana i program jest możliwy do wprowadzenia. Szacowany koszt to około 80 zł na dawcę, jeśli bada się pule próbek osocza od 24 dawców Rh-ujemnych o fenotypie C+ lub E+.

### 3. Identyfikacja słabej odmiany antygeny D typu 1, 2 lub 3 u biorców i kobiet w ciąży niepodatnych na alloimmunizację

Wprowadzenie badań molekularnych do analizy genu *RHD* u pacjentów, u których występowały trudności z określeniem antygeny RhD, z powodu niejednoznacznych wyników badań serologicznych, pozwoliło na identyfikację odmian antygeny D [12, 13, 27].

Wieloletnie obserwacje wykazały, że osoby ze słabą odmianą antygeny D typu 1, 2 lub 3 nie wytwarzają alloprzeciwciał anty-D, mimo ekspozycji na RhD-dodatnią krew (niezgodny antygenowo płód; przetoczona krew). Jeśli wykrywa się u nich przeciwciała anty-D, to zawsze mają one charakter autoprzeciwciał [27]. Osobom z tymi odmianami

słabego antygeny D można więc przetaczać krwinki czerwone od dawców RhD-dodatnich, a kobiety nie muszą dostawać immunoglobuliny anti-D po poronieniu i po urodzeniu dziecka RhD-dodatniego. U osób z innymi odmianami słabego antygeny D, m.in. słaby D typu 4.2 (DAR), 11 i 15, opisano alloimmunizację przez antygen D [27, 28].

Wykorzystywana w Instytucie metodyka genotypowania odmian antygeny D u osób z różnymi lub słabo dodatnimi wynikami testów serologicznych pozwoliła ocenić odsetek osób ze słabą lub częściową odmianą antygeny D w Polsce. Podsumowanie z 2019 roku, obejmujące 693 osoby z takimi niejednoznacznymi wynikami, wykazało, że allele odpowiedzialne za słaby antygen D typu 1, 2, 3 wykryto u 79% badanych, a u pozostałych 21% osób zidentyfikowano allele wskazujące, że osoby te są podatne na immunizację antygenem D (definiujące antygen D słaby, D częściowy albo DEL) [29].

Wcześniejsze szacunki obejmujące samych dawców krwi wykazały, że rutynowe badania serologiczne antygeny D są niejednoznaczne u 0,2% dawców (20/10 000) i że większość z nich (14/10 000) też stanowiły osoby określone genetycznie jako *RHD\*01W.1*, *RHD\*01W.2*; *RHD\*01W.3*, czyli niepodatne na alloimmunizację [30].

#### **4. Nieinwazyjne badania genów płodu u kobiet z konfliktem serologicznym**

W Instytucie opracowano i wdrożono nieinwazyjne badania genów *RHD* i *RHCE* płodu u kobiet z konfliktem serologicznym z zakresie antygenów D, C, c i E. Diagnostyka prenatalna u kobiet z przeciwciałami anti-D (+C), anti-c, anti-E lub anti-G jest przeprowadzana u ciężarnych z całej Polski. W badaniach standaryzacyjnych uzyskano 100% zgodności fenotypu/genotypu noworodka z wynikami badania DNA płodu z osocza matki. W trakcie standaryzacji są badania allelu *KEL\*1* w osoczu ciężarnych z alloprzeciwciałami anti-K [31–36].

#### **5. Nieinwazyjne badania RHD płodu u kobiet RhD-ujemnych w celu kwalifikacji kobiet do śródciążowego podawania immunoglobuliny anti-D**

Oznaczanie genu *RHD* płodu u ciężarnych kobiet RhD-ujemnych w celu kwalifikacji do śródciążowego podania immunoglobuliny anti-D tylko kobietom, których płód jest RhD-dodatni, zostało wdrożone jako program ogólnokrajowy w niektórych krajach Europy Zachodniej [37–40]. Pozwoliło to na 40% oszczędności w zużyciu immunoglobuliny anti-D. Oszczędność ta równoważyła koszty wprowadzenia programu. Istotne jest, że wdrożenie

badania powoduje, że kobietom z płodem RhD-ujemnym nie podaje się niepotrzebnie produktu krwiopochodnego. W Instytucie opracowano system prowadzenia takich badań, możliwy do zastosowania w skali masowej [41, 42]. Automatyzacja procesu izolacji DNA z osocza i przygotowywania reakcji PCR do wykrywania w nim genu *RHD* płodu pozwala na objęcie takimi badaniami wszystkich kobiet RhD-ujemnych w Polsce, nawet w jednym lub dwóch ośrodkach w kraju, przy zapewnieniu logistyki dowozu próbek.

#### **6. Genotypowanie antygenów krwinek czerwonych w celu poszukiwania dawców „antygenowo-ujemnych” dla pacjentów zimmunizowanych**

Alloimmunizacja antygenami występującymi z dużą częstością w populacji (tzw. antygeny powszechne; HFA, *high-frequency blood group antigens*) stanowi bardzo istotny problem w transfuzjologii ze względu na trudności w znalezieniu dawcy bez tego antygeny dla pacjenta wymagającego przetoczenia [43, 44]. Znalezienie odpowiedniego dawcy wymaga często przebadania kilkuset, a nawet kilku tysięcy krwiodawców. Wykonanie tego przy użyciu metod serologicznych jest często niemożliwe ze względu na brak surowic diagnostycznych. Z takimi sytuacjami wielokrotnie ma do czynienia Pracownia Immunologii Krwinki Czerwonej Instytutu, w której przeprowadza się badania konsultacyjne, identyfikujące przeciwciała przeciw antygenom HFA [45, 46]. Wdrożenie metod biologii molekularnej do typowania polimorfizmów definiujących przeciwstawne rzadkie antygeny (LFA, *low-frequency blood group antigen*) w celu identyfikacji dawców, którzy nie mają antygenów HFA, jest obecnie istotnym wyzwaniem dla polskiego krwiodawstwa i dla Instytutu.

Instytut dokonał podsumowania wyników badań przeciwciał odpornościowych skierowanych do antygenów powszechnych z ostatnich 17 lat i z analiz tych wyników, jakimi dawcami o rzadkich grupach krwi muszą dysponować jednostki organizacyjne publicznej służby krwi, by zapewnić bezpieczeństwo przetoczeń u pacjentów, w tym kobiet w ciąży i ich płodów/novorodków [46], wymienionymi w Rozporządzeniu MZ z dnia 6 lutego 2017 roku (Dz. U. z 2017 r. poz. 235).

W ramach badań finansowanych ze środków Instytutu opracowano metodykę opartą na technice *real-time* PCR do identyfikacji dawców dla pacjentów z przeciwciałami anti-Rh51(MAR)-like, gdyż jedynie metodami genetycznymi można ustalić homozygotyczny genotyp *C<sup>w</sup>/C<sup>w</sup>* u osób o fenotypie C+/Cw+ [47]. Zasób 7 zidentyfikowanych wtedy

dawców  $C^w/C^w$  wymaga ciągłego wzbogacania i dlatego w 2019 roku Instytut ponownie poszukiwał takich dawców dla kolejnego pacjenta (znaleziono 4 nowych dawców).

W Instytucie opracowano też metodykę niskokosztowych badań przeglądowych do genotypowania najczęstszych mutacji odpowiedzialnych za brak ekspresji antygenów HFA, takich jak:  $Yt^a$ ,  $Kp^b$ ,  $Dj^b$ ,  $Co^a$ ,  $Lu^b$ ,  $Kn^a$ ,  $Lw^a$ ,  $Vel$ ,  $LAN$  [48]. Przebadanie 948 dawców zaowocowało znalezieniem 6 dawców bez antygeny  $Yt^a$  i jednego dawcy  $LAN(-)$ . Obecnie badania poszerzono o kolejne genotypowania antygenów:  $Lu8/14$ ,  $SC1/2$ ,  $Jr^a$  (2 najczęstsze mutacje),  $LAN$  (kolejne mutacje),  $P1/P2$ . Należy podkreślić, że żaden z dostępnych testów komercyjnych nie zawiera odczynników pozwalających na identyfikację dawców bez tych ostatnich wymienionych antygenów HFA.

Instytut widzi konieczność utworzenia Krajowego Rejestru Dawców Rzadkich Grup Krwi w stworzonym systemie informatycznym e-krew, który ma obsługiwać publiczną służbę krwi. Cyfryzacja pozwoli w przyszłości czuwać nad zasobami rejestru, dbać o stały dostęp do składników krwi o rzadkiej grupie (zarządzanie kalendarzem pobrań, ewidencja pobranych/mrożonych składników) i udostępniać zasób tego rejestru rejestrom zagranicznym.

### 7. Tworzenie rejestru dawców z oznaczonymi antygenami HPA i HNA dla celów leczenia pacjentów zimmunizowanych tymi antygenami

Metody biologii molekularnej są wiodącymi metodami oznaczania antygenów HPA i HNA zarówno u pacjentów z podejrzeniem alloimmunizacji, jak i u dawców krwi, ponieważ poza oznaczeniem antygeny HPA-1a nie są dostępne komercyjne testy fenotypowania ww. antygenów. Szczególnie znaczenie ma tworzenie rejestrów dawców o oznaczonych antygenach HPA dla celów diagnostycznych i transfuzjologicznych (tab. 3) [7, 8, 49–52].

Instytut opublikował podsumowanie dostępności dawców koncentratów płytkowych (KKP) o oznaczonych antygenach HPA i/lub HLA oraz metod wykorzystywanych w Polsce do tego celu [52] i widzi konieczność utworzenia Krajowego Rejestru Dawców o Oznaczonych Antygenach HPA, także obsługiwanego przez system e-krew. Niezbędne jest rozszerzenie rejestru o kolejnych dawców HPA-1a-ujemnych i HPA-5b-ujemnych, gdyż rośnie zapotrzebowanie na KKP o takim fenotypie, przede wszystkim do przetoczeń u płodów i noworodków ze zdiagnozowaną/podejrzewaną alloimmunologiczną małopłytkowością płodów i noworodków (AIMP/N), wynikającą z konfliktu

matczyno-płodowego [53–56]. Potrzeba doboru dawcy KKP zgodnego z genotypem biorcy może też dotyczyć innych antygenów HPA, w zależności od swoistości przeciwciał przeciwpłytkowych. Może dodatkowo wymagać doboru dawcy zgodnego pod względem antygenów HLA klasy I [57].

W przypadku antygenów HNA w literaturze wskazuje się potrzebę oznaczania genotypu HNA-3b/b, ponieważ dawcy o takim genotypie powinni być badani na obecność przeciwciał anty-HNA-3a, gdyż są one najczęstszą przyczyną ostrego poprzetoczeniowego uszkodzenia płuc (TRALI, *transfusion-related acute lung injury*) spowodowanego immunizacją do antygenów HNA. Postuluje się nawet odsuwanie od oddawania krwi dla celów klinicznych dawców z przeciwciałami anty-HNA-3a [58, 59].

Podsumowując, metody biologii molekularnej są stosowane w laboratorium referencyjnym Instytutu do bieżących badań konsultacyjnych w ramach dotacji na działalność publicznej służby krwi (art. 25 Ustawy z dnia 22 sierpnia 1997 r. o publicznej służbie krwi). Jednocześnie laboratorium Instytutu, korzystając z funduszy własnych lub funduszy uzyskanych z grantów, wprowadza i rekomenduje do użycia takie metody badań, które są istotne w krwiodawstwie i krwiolecznictwie dla zwiększenia bezpieczeństwa przetoczeń.

### Piśmiennictwo

1. Yamamoto F, Marken J, Tsuji T, et al. Cloning and characterization of DNA complementary to human UDP-GalNAc: Fuc alpha 1-2Gal alpha 1-3GalNAc transferase (histo-blood group A transferase) mRNA. *J Biol Chem.* 1990; 265(2): 1146–1151, indexed in Pubmed: [2104828](#).
2. Daniels G. *Human Blood Groups*, 3rd Edition. Wiley-Blackwell 2013.
3. Reid ME, Lomas-Francis C, Olsson M. *The blood group antigen*. 3rd Edition. Elsevier Ltd London, UK 2012.
4. Newman PJ, Derbes RS, Aster RH. The human platelet alloantigens, PIA1 and PIA2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J Clin Invest.* 1989; 83(5): 1778–1781, doi: [10.1172/JCI114082](#), indexed in Pubmed: [2565345](#).
5. Huizinga TW, Kleijer M, Tetteroo PA, et al. Biallelic neutrophil Na-antigen system is associated with a polymorphism on the phospho-inositol-linked Fc gamma receptor III (CD16). *Blood.* 1990; 75(1): 213–217, indexed in Pubmed: [2136803](#).
6. Brojer E, Uhrynowska M, Drzewek K, et al. Serologiczna i genetyczna analiza częstości antygenów NA ludzkich granulocytów. *Acta Haematol Pol.* 1997; 28: 155–162.
7. Drzewek K, Brojer E, Zupańska B. The frequency of human platelet antigen (HPA) genotypes in the Polish population. *Transfus Med.* 1998; 8(4): 339–342, doi: [10.1046/j.1365-3148.1998.00164.x](#), indexed in Pubmed: [9881429](#).

8. Guz K, Brojer E, Zupańska B. Implications of NA1/NA2 and SH genotyping results in the Polish population with regard to the new nomenclature of granulocyte alloantigens. *Transfusion*. 2000; 40(4): 490–491; author reply 492, doi: [10.1046/j.1537-2995.2000.40040490.x](https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.2000.40040490.x), indexed in Pubmed: [10773063](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10773063/).
9. Guz K, Orzińska A, Brojer E. Przegląd metod genotypowania antygenów krwinek czerwonych. *J Transfus Med*. 2013; 6: 90–95.
10. Orzińska A, Guz K, Brojer E. Nowe osiągnięcia w badaniach nad podstawami molekularnymi grup krwi. *J Transfus Med*. 2013; 6: 101–104.
11. Westhoff CM. Molecular DNA-based testing for blood group antigens: recipient-donor focus. *ISBT Science Series*. 2013; 8(1): 1–5, doi: [10.1111/voxs.12049](https://doi.org/10.1111/voxs.12049).
12. Peyrard T. Use of genomics for decision-making in transfusion medicine: laboratory practice. *ISBT Science Series*. 2013; 8(1): 11–15, doi: [10.1111/voxs.12002](https://doi.org/10.1111/voxs.12002).
13. Svensson A, Delaney M. Considerations of red blood cell molecular testing in transfusion medicine. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015; 15: 1455–1464.
14. Reid ME, Denomme GA. DNA-based methods in the immunohematology reference laboratory. *Transfus Apher Sci*. 2011; 44(1): 65–72, doi: [10.1016/j.transci.2010.12.011](https://doi.org/10.1016/j.transci.2010.12.011), indexed in Pubmed: [21257350](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21257350/).
15. Haer-Wigman L, Ji Y, Lodén M, et al. Comprehensive genotyping for 18 blood group systems using a multiplex ligation-dependent probe amplification assay shows a high degree of accuracy. *Transfusion*. 2013; 53(11 Suppl 2): 2899–2909, doi: [10.1111/trf.12410](https://doi.org/10.1111/trf.12410), indexed in Pubmed: [23992446](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23992446/).
16. Guz K, Orzińska A, Brojer E. Rozwój technologii opartych na metodach biologii molekularnej do oznaczania grup krwi. *J Transfus Med*. 2019; 12(2): 56–64, doi: [10.5603/jtm.2019.0002](https://doi.org/10.5603/jtm.2019.0002).
17. Orzińska A, Guz K, Brojer E. Potential of next-generation sequencing to match blood group antigens for transfusion. *Intern J Clin Trans Med*. 2019; Volume 7: 11–22, doi: [10.2147/ijctm.s175142](https://doi.org/10.2147/ijctm.s175142).
18. Michalewska B, Żupańska B, Pelc-Kłopotowska M, et al. Alloimmunizacja u chorych na niedokrwistość auto-immunohemolityczną oraz genotypowanie krwinek czerwonych w celu udoskonalenia doboru krwi do przetoczeń. *J Transfus Med*. 2009; 2: 14–19.
19. Olsson ML, Michalewska B, Hellberg A, et al. A clue to the basis of allelic enhancement: occurrence of the Ax subgroup in the offspring of blood group O parents. *Transfus Med*. 2005; 15(5): 435–442, doi: [10.1111/j.1365-3148.2005.00603.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2005.00603.x), indexed in Pubmed: [16202060](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16202060/).
20. Polin H, Pelc-Kłopotowska M, Danzer M, et al. Compound heterozygosity of two novel RHAG alleles leads to a considerable disruption of the Rh complex. *Transfusion*. 2016; 56(4): 950–955, doi: [10.1111/trf.13476](https://doi.org/10.1111/trf.13476), indexed in Pubmed: [27079312](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27079312/).
21. Mota M, Fonseca NL, Rodrigues A, et al. Anti-D alloimmunization by weak D type 1 red blood cells with a very low antigen density. *Vox Sang*. 2005; 88: 130–135.
22. St-Louis M, Lebrun A, Goldman M, et al. Alloimmunization of patients by blood units harboring distinct DEL variants. *Immunohematology*. 2013; 29(4): 136–140, indexed in Pubmed: [24689683](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24689683/).
23. Orzińska A, Guz K, Polin H, et al. RHD variants in Polish blood donors routinely typed as D-. *Transfusion*. 2013; 53(11 Suppl 2): 2945–2953, doi: [10.1111/trf.12230](https://doi.org/10.1111/trf.12230), indexed in Pubmed: [23634715](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23634715/).
24. Pelc-Kłopotowska M, Orzińska A, Michalewska B, et al. Badanie obecności fragmentów genu RHD u dawców RhD ujemnych z zastosowaniem manipulowania i technologii real-time PCR. *J Transfus Med*. 2008; 1: 40–45.
25. Flegel WA, Wagner FF, Müller TH, et al. Rh phenotype prediction by DNA typing and its application to practice. *Transfus Med*. 1998; 8(4): 281–302, doi: [10.1046/j.1365-3148.1998.00173.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-3148.1998.00173.x), indexed in Pubmed: [9881423](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9881423/).
26. Crottet SL, Henny C, Meyer S, et al. Implementation of a mandatory donor RHD screening in Switzerland. *Transfus Apher Sci*. 2014; 50(2): 169–174, doi: [10.1016/j.transci.2014.02.011](https://doi.org/10.1016/j.transci.2014.02.011), indexed in Pubmed: [24679597](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24679597/).
27. Sandler SG, Chen LN, Flegel WA. Serological weak D phenotypes: a review and guidance for interpreting the RhD blood type using the RHD genotype. *Br J Haematol*. 2017; 179(1): 10–19, doi: [10.1111/bjh.14757](https://doi.org/10.1111/bjh.14757), indexed in Pubmed: [28508413](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28508413/).
28. Pham BN, Roussel M, Gien D, et al. Molecular analysis of patients with weak D and serologic analysis of those with anti-D (excluding type 1 and type 2). *Immunohematology*. 2013; 29(2): 55–62, indexed in Pubmed: [24094237](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24094237/).
29. Pelc-Kłopotowska M, Guz K, Orzińska A, et al. Evaluation of reactivity of various monoclonal anti-D reagents with red blood cells of individuals with inconclusive RHD variants. XXVIII PTHiT, Łódź 12-14.09. 2019, Zeszyt Streszczeń.: 58–59.
30. Pelc-Kłopotowska M, Guz K, Wróbel J, et al. Charakterystyka molekularna i serologiczna słabych odmian antygeny D u dawców RCKiK w Białymstoku. *Acta Haematologica Polonica*. 2015; 46: 123, doi: [10.1016/j.achaem.2015.07.245](https://doi.org/10.1016/j.achaem.2015.07.245).
31. Orzińska A, Guz K, Brojer E, et al. Badanie genu RHD płodu w osoczu zimmunizowanej matki Rh ujemnej pozwoliło na uniknięcie metod inwazyjnych i urodzenie zdrowego dziecka. *Gin Pol*. 2004; 75; 12: 963–965.
32. Guz K, Brojer E, Żupańska B, et al. Nieinwazyjna diagnostyka RHD płodu u RhD ujemnych kobiet ciężarnych – wyniki wstępne. *Gin Pol*. 2004; 75: 21–25.
33. Brojer E, Zupańska B, Guz K, et al. Noninvasive determination of fetal RHD status by examination of cell-free DNA in maternal plasma. *Transfusion*. 2005; 45(9): 1473–1480, doi: [10.1111/j.1537-2995.2005.00559.x](https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2005.00559.x), indexed in Pubmed: [16131380](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16131380/).
34. Orzińska A, Guz K, Brojer E, et al. Preliminary results of fetal Rhc examination in plasma of pregnant women with anti-c. *Prenat Diagn*. 2008; 28(4): 335–337, doi: [10.1002/pd.1977](https://doi.org/10.1002/pd.1977), indexed in Pubmed: [18382999](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18382999/).
35. Orzińska A, Guz K, Gala K, et al. The influence of methods of maternal collection and storage and DNA isolation on detection of fetal genes in maternal plasma in noninvasive prenatal diagnostics. *Diagn Lab*. 2007; 43: 69–77.
36. Orzińska A, Guz K, Dębska M, et al. 14 Years of Polish Experience in Non-Invasive Prenatal Blood Group Diagnosis. *Transfus Med Hemother*. 2015; 42(6): 361–364, doi: [10.1159/000440821](https://doi.org/10.1159/000440821), indexed in Pubmed: [26733766](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26733766/).
37. Clausen FB, Steffensen R, Christiansen M, et al. Routine noninvasive prenatal screening for fetal RHD in plasma of RhD-negative pregnant women—2 years of screening experience from Denmark. *Prenat Diagn*. 2014; 34(10): 1000–1005, doi: [10.1002/pd.4419](https://doi.org/10.1002/pd.4419), indexed in Pubmed: [24860987](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24860987/).
38. Thurik FF, Ait Soussan A, Bossers B, et al. Analysis of false-positive results of fetal RHD typing in a national screening program reveals vanishing twins as potential cause for discrepancy. *Prenat Diagn*. 2015; 35(8): 754–760, doi: [10.1002/pd.4600](https://doi.org/10.1002/pd.4600), indexed in Pubmed: [25855535](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25855535/).
39. Szczepura A, Osipenko L, Freeman K. A new fetal RHD genotyping test: costs and benefits of mass testing to target antenatal anti-D prophylaxis in England and Wales. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2011; 11: 5, doi: [10.1186/1471-2393-11-5](https://doi.org/10.1186/1471-2393-11-5), indexed in Pubmed: [21244652](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21244652/).

40. Tiblad E, Taune Wikman A, Ajne G, et al. Targeted routine antenatal anti-D prophylaxis in the prevention of RhD immunisation-outcome of a new antenatal screening and prevention program. *PLoS One*. 2013; 8(8): e70984, doi: [10.1371/journal.pone.0070984](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070984), indexed in Pubmed: [23940682](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23940682/).
41. Orzińska A, Guz K, Purchla-Szepiła S, et al. 2-year experience in non-invasive prenatal diagnostics of fetal rhd for targeted anti-d immunoprophylaxis in Poland. *Vox Sanguinis*. 2018; 113(Suppl. 1): 276.
42. Orzińska A, Guz K, et al. Purchla-Szepiła 3-lata nieinwazyjnej diagnostyki RHD płodu dla celowanej śródciażowej immunoprophylaktyki anti-D. XXVIII PTHiT, Łódź 12-14.09. 2019, Zeszyt Streszczeń 95–96.
43. Michalewska B. Częstość niezgodnych prób krzyżowych przy braku alloprzeciwciał wykrywanych w badaniach przeglądowych. *Acta Haemat Pol*. 2002; 33: 205–212.
44. Michalewska B, Pelc-Kłopotowska M, Łopieńska H, et al. Ocena w teście erytrofagocytozy klinicznego znaczenia rzadko wykrywanych alloprzeciwciał czerwionokrwińkowych. *Acta Haemat Pol*. 2006; 37: 407–414.
45. Łopieńska H, Michalik M, Ożóg A, et al. Alloprzeciwciała do antygenów występujących z wysoką częstością wykryte w Polsce w latach 2000–2012. *Acta Haematologica Polonica*. 2013; 44: 120, doi: [10.1016/j.achaem.2013.07.108](https://doi.org/10.1016/j.achaem.2013.07.108).
46. Pelc-Kłopotowska M, Guz K, Orzińska A, et al. Antibodies against high frequency antigen in Polish patients between 2000 and 2017. *Vox Sang*. 2018; 113(Suppl. 1): 227.
47. Orzińska A, Guz K, Michalewska B, et al. Molecular screening of the C antigen for typing donors compatible with patients with anti-MAR-like antibodies. *Blood Transfus*. 2016; 14(6): 573–576, doi: [10.2450/2015.0044-15](https://doi.org/10.2450/2015.0044-15), indexed in Pubmed: [26509828](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26509828/).
48. Guz K, Orzińska A, Pelc-Kłopotowska M, et al. Identification of blood donors with rare red blood cell phenotypes using low-cost protocols. *Vox Sang*. 2018; 113(Suppl. 1): 263.
49. Li RS, Qiao ZL, Ling B, et al. Establishment of reference panel for human platelet antigen genotyping. *Vox Sang*. 2014; 107(2): 166–170, doi: [10.1111/vox.12149](https://doi.org/10.1111/vox.12149), indexed in Pubmed: [24697294](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24697294/).
50. Merzoni J, Fagundes IS, Lunardi LW, et al. Human platelet antigen genotyping of platelet donors in southern Brazil. *Int J Immunogenet*. 2015; 42(5): 329–335, doi: [10.1111/iji.12220](https://doi.org/10.1111/iji.12220), indexed in Pubmed: [26211915](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26211915/).
51. Maślanka K, Guz K, Uhrynowska M, et al. Rejestr dawców z oznaczonymi swoistymi antygenami płytek krwi (HPA) i jego zastosowanie w transfuzjologii. *Acta Haematol Pol*. 2005; 36: 189–196.
52. Guz K, Łopacz P, Gierszon A, et al. Ocena dostępności dawców koncentratów płytkowych o oznaczonych antygenach leukocytarnych i płytkowych dla pacjentów z przeciwciałami anti-HLA i/lub anti-HPA. *J Transfus Med*. 2019; 12(1): 1–12.
53. Lucas GF, Bendukidze N. HPA-1a(-), 5b(-) platelets for use in neonatal alloimmune thrombocytopenia--from 'Cinderella' product to standard component. *Transfus Med*. 2014; 24(2): 127–129, doi: [10.1111/tme.12108](https://doi.org/10.1111/tme.12108), indexed in Pubmed: [24684573](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24684573/).
54. Bertrand G, Kaplan C. How do we treat fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia? *Transfusion*. 2014; 54(7): 1698–1703, doi: [10.1111/trf.12671](https://doi.org/10.1111/trf.12671), indexed in Pubmed: [24773309](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24773309/).
55. Uhrynowska ME, Dębska M, Guz K, et al. [PREVFNAIT prevention of foetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia (FNAIT) in Polish foetuses and newborns--the PREVFNAIT program]. *Ginekol Pol*. 2015; 86(1): 62–66, doi: [10.17772/gp/1901](https://doi.org/10.17772/gp/1901), indexed in Pubmed: [25775877](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25775877/).
56. Brojer E, Husebekk A, Dębska M, et al. Fetal/Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia: Pathogenesis, Diagnostics and Prevention. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2016; 64(4): 279–290, doi: [10.1007/s00005-015-0371-9](https://doi.org/10.1007/s00005-015-0371-9), indexed in Pubmed: [26564154](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26564154/).
57. Weinstock C, Schnaidt M. Human Leucocyte Antigen Sensitisation and Its Impact on Transfusion Practice. *Transfus Med Hemother*. 2019; 46(5): 356–369, doi: [10.1159/000502158](https://doi.org/10.1159/000502158), indexed in Pubmed: [31832061](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31832061/).
58. Storch EK, Hillyer CD, Shaz BH. Spotlight on pathogenesis of TRALI: HNA-3a (CTL2) antibodies. *Blood*. 2014; 124(12): 1868–1872, doi: [10.1182/blood-2014-05-538181](https://doi.org/10.1182/blood-2014-05-538181), indexed in Pubmed: [25006121](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25006121/).
59. Bougie DW, Peterson JA, Kanack AJ, et al. Transfusion-related acute lung injury-associated HNA-3a antibodies recognize complex determinants on choline transporter-like protein 2. *Transfusion*. 2014; 54(12): 3208–3215, doi: [10.1111/trf.12717](https://doi.org/10.1111/trf.12717), indexed in Pubmed: [24846273](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24846273/).