25 år i år: Nordiska referenslaboratoriet för blodgruppsgenomik

Åsa Hellberg
Processledare

Genteknologiske metoder indenfor immunhematologi

Rekommandation
(från Nordiska överläkarmötet i Norge oktober 2001)

”For at fastholde analyse kvaliteten bør de almindeligvis udførte analyser med DNA-baseret bestemmelse af blodtyper centraliseres til nogle få transfusionscentre med stor blodtypeserologisk og molekylærbiologisk kompetence.

Transfusionscentre, som tilbyder disse analyser til klinisk anvendelse, bør deltage i et udvekslingsprogram for blodprøver med henblik på kvalitetssikring.

Et nordisk referencelaboratorium med et bredt sortiment af analyser etableres i Lund.”

Viktiga milstolpar

- 1990 *ABO*-genen klonades
- 1993-97 Metoder för att genotypa *ABO* utvecklades
- 1997-98 Metoder för *KEL, RH, FY och JK*
- 1998 Metod för fostertypning från amnion (*RHD* och *KEL*)
- 2004 Ackreditering
- 2004 Fostertypning på cellfrittDNA (cfDNA)
- 2008 Flödescytometri för ABO

- Aktiv forskargrupp led av MLO
- Fortsatt metodutveckling

Laboratoriet erbjuder idag:

- typning av kliniskt relevanta blodgruppsgener
- flödecytometri
- fostertypning med cfDNA
- typning av HPA (trombocytantigen)
- typning av högfrekvensantigen

- DNA-extraktion till Transplantationsimmunologi och Klinisk immunologi
- PCR/sekvensering till Klinisk immunologi

Metoder

- Konventionell PCR
- Realtids-PCR
  - Kvantitativ
  - Allelisk diskriminering
- Luminex
- Sangersekvensering

DNA-extraktion från:
- Blod
- Plasma
- Amnion
- Kindskrap

- Massiv parallellsekvensering
- ONT (Oxford Nanopore Technology)
  Longread sequencing

Indikationer för genomisk typning

ABO* och *RHD/CE

Diskrepans i serologi

Organtransplantation:

- A^1/A^2
- klargöra *ABO/RHD*

Fynd från fetal *RHD-screen*

RHD-zygositet

Indikationer för genomisk typning

ABO* och *RHD/CE

Diskrepans i serologi

Organtransplantation:

- A^1/A^2
- klargöra *ABO/RHD*

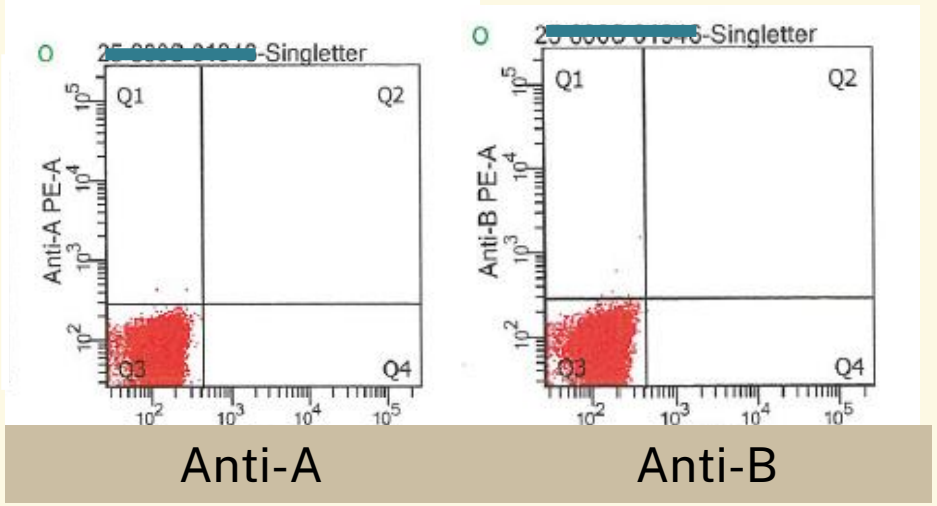
Fynd från fetal *RHD-screen*

RHD-zygositet

Erytrocyttypning				Plasmatypning	
Anti-A	Anti-B	Anti-A	Anti-B	A_1-blkr	B-blkr
-	-	-	-	-	++++

PCR-ASP: *ABO*O.01.01/O.02*

Flödescytometri



Anti-A Anti-B

*ABO*O.02*-allelen är associerad med försvagning av anti-A i plasma

Transfusion 2008;48:1650-7

BLOOD COMPONENTS

Investigation into A antigen expression on O^2 heterozygous group O–labeled red blood cell units

Mark H. Yazer, Annika K. Hult, Åsa Hellberg, Bahram Hosseini-Maaf, Monica M. Palcic, and Martin L. Olsson

Inget detekterbart A-antigen men mycket lägre titer mot A-blodkroppar jämfört med *ABO*O.01*-alleler

*ABO*O.02*-allelen är associerad med försvagning av anti-A i plasma

Transfusion 2005;45:1331-4

IMMUNOHEMATOLOGY

Nondeletional *ABO*O* alleles frequently cause blood donor typing problems

Franz F. Wagner, Rainer Blasczyk, and Axel Seltsam

38/45 patienter med reducerat/inget anti-A hade en *ABO*O.02*-allel

Indikationer för genomisk typning

ABO* och *RHD/CE

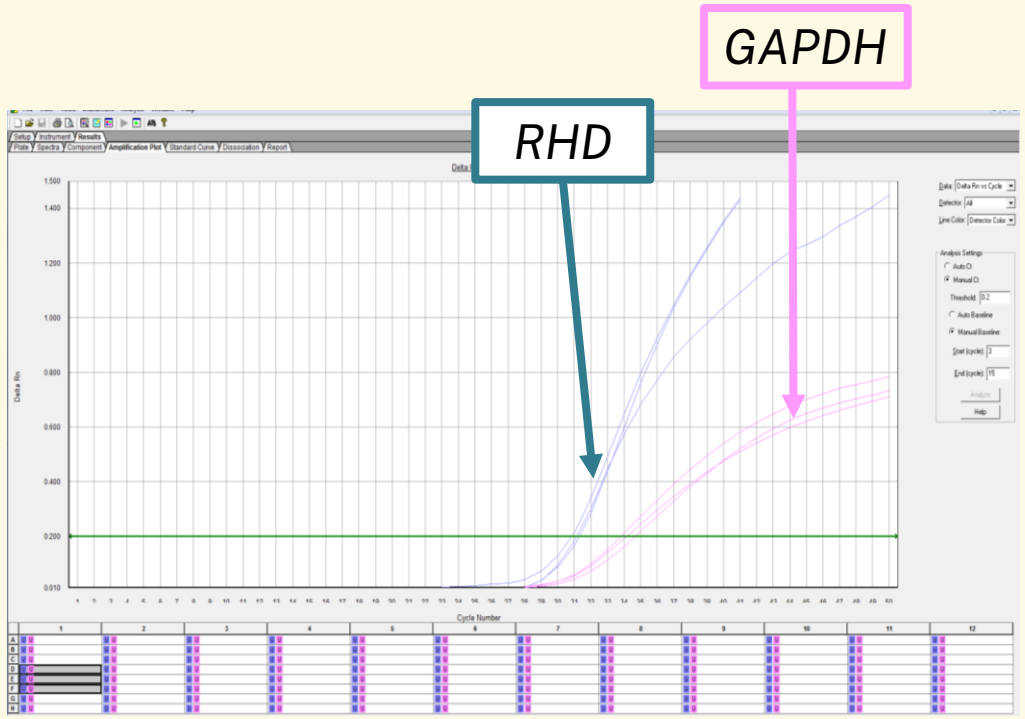
Diskrepans i serologi

Organtransplantation:

- A^1/A^2
- klargöra *ABO/RHD*

Fynd från fetal *RHD-screen*

RHD-zygositet



PCR-ASP inklusive analys för:
- *RHD*08N.01*
- *RHD*01W.1- RHD*01W.5*

Sangersekvensering

Ge Rh-profylax?

Blodgrupp för blodgivare

Indikationer för genomisk typning

Fenotypning ej möjlig
Transfusion
DAT+
Avsaknad av reagens

IDCORE^{XT}
Luminex-baserat, CE-märkt, detekterar 37 antigen

Stöd vid antikroppsutredningar

Genotyp:
*RHCE*cE KEL*k_KPB_JSB JK*A, JK*B FY*A, FY*B GYPA*M, GYPA*N GYPB*s*
*DI*B DO*B CO*A YT*A LU*B*

Fenotyp:
C- e- K- S-
Dia- Doa- Cob- Ytb- Lua-

Anti-C, -e, -S, -Doa

Indikationer för genomisk typning

Fostertypning med cfDNA
RHD- och *RHc*-typning, immuniserade kvinnor

Realtids-PCR
Svarstid 7 dagar

Fetal *RHD*-screen för södra sjukvårdsregionen

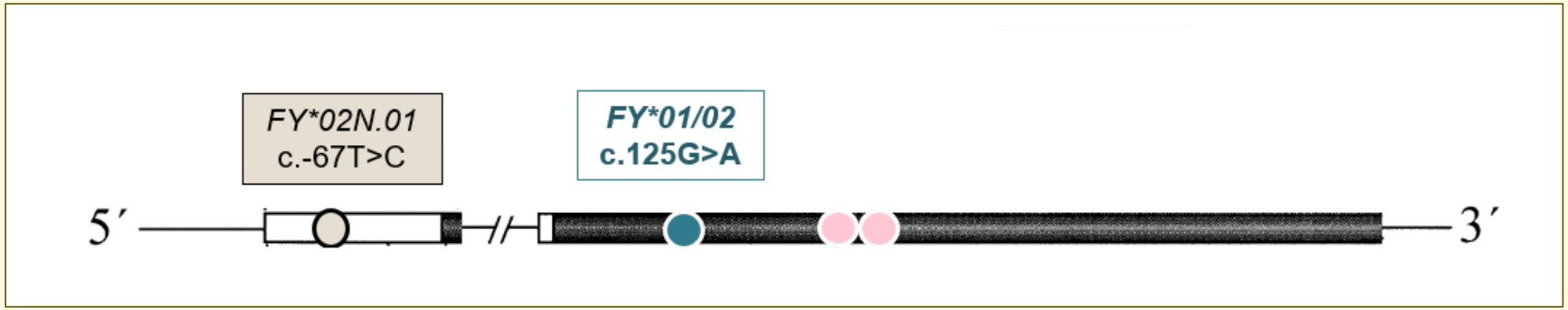
Realtids-PCR
CE-IVDR-märkt kit
Automatiserat flöde från EDTA-rör till Prosang
Analyserar 3500 prov / år

Indikationer för genomisk typning

FY

Frågeställning:

BEN (Benign etnisk neutropeni) eller DANC (Duffy-null Associated Neutrophil Count)?



*FY*02N.01/02N.01*
Kopplad till BEN/DANC

Viktigt att veta:
Ytterligare tester/undersökningar undviks
Vid cancerbehandling undviks: - fördröjd behandling - minskade doser - uteslutning ur forskningsstudier
Även vid andra läkemedel undviks lägre doser/ stopp för läkemedel

Årets skörd

ABO n=55		
Svaga i plasmagruppering	7	Sex bekräftat blodgrupp O (varav en *ABO*O.02*), en *ABO*??*
A-svag	33	Många *ABO*A2.01/B.01,* 13 subgrupper, några chimärer
B-svag	6	Fyra subgrupper , en *O*-allel, en utan förklaring
O eller B?	1	*O*O1(796A)*
A1/A2?	1	*ABO*A1.01/A1.01,* flödet visar transfusionsblandbild med A2-blod
ABO och *RHD* (DAT+, köld, transfunderad)	3	Bekräftat blodgrupp
Kvalitetskontroll	1	OK

Årets skörd

IDCORE	n=32
Tranfusionskrävande	8
Stöd till antikroppsutredning	10
Testerytrocyt	8
Kvalitetskontroller	3
Blodgivare	3

Övriga
H svag/neg
DANC? *FY*-typning
Vel
JK null?
HPA1a/b

Årets skörd

RHD/CE	n=70	
Fynd i fetal *RHD*-screen	7	Sju maternella gener → utvidgad serologi
RhD-svag/neg?	32	1 null, 8 svaga alleler, 16 (*RHD*01W.1-3), 2* chimärer
Transfusion	2	Bekräftat blodgrupp
Fostertypning	23	Predikterat fosterblodgrupp
CE	1	*RHCE*02.31/03 (leder till Ce+svag)*
RHD-zygositet	2	Fastställt zygositet
Kvalitetskontroll	3	OK

ABO??*

Erytrocyttypning				Plasmatypning	
Anti-A	Anti-B	Anti-A	Anti-B	A_1-blkr	B-blkr
-	-	-	-	+	++++

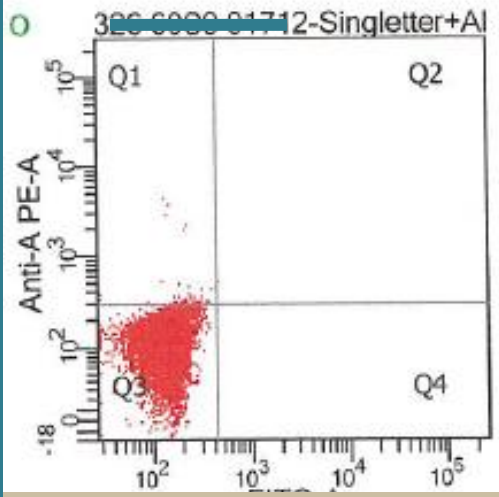
Plasmatypning			
A_1-blkr	A_2-blkr	B-blkr	O-blkr
++	-	++++	-

PCR-ASP: *ABO*A1.01/O.01.01*

Sekvens: *ABO*A1(c.677C>T)/O.01.01* *p.Thr226Ile*

Egenskap	Treonin (Threonine)	Isoleucin (Isoleucine)
Kemisk klass	Polär (oladdad), hydrofil (vattenälskande)	Icke-polär, hydrofob (vattenavvisande)

Flödescytometri



Anti-A

2004 patient med samma fenotyp och genotyp

ABO??*

Ett kontrollprov begärs

C:a 0,2% av erytrocyterna uppvisar ett varierande A-uttryck upp till det man finner vid blodgrupp A.

A-antigen uttrycket kunde inte bekräftas med adsorption/elueringsanalys.

Ej lämplig som blodgivare.

Blodgrupp sätts till X.

TACK