

Imunohematologická DNA diagnostika

Martin Písačka

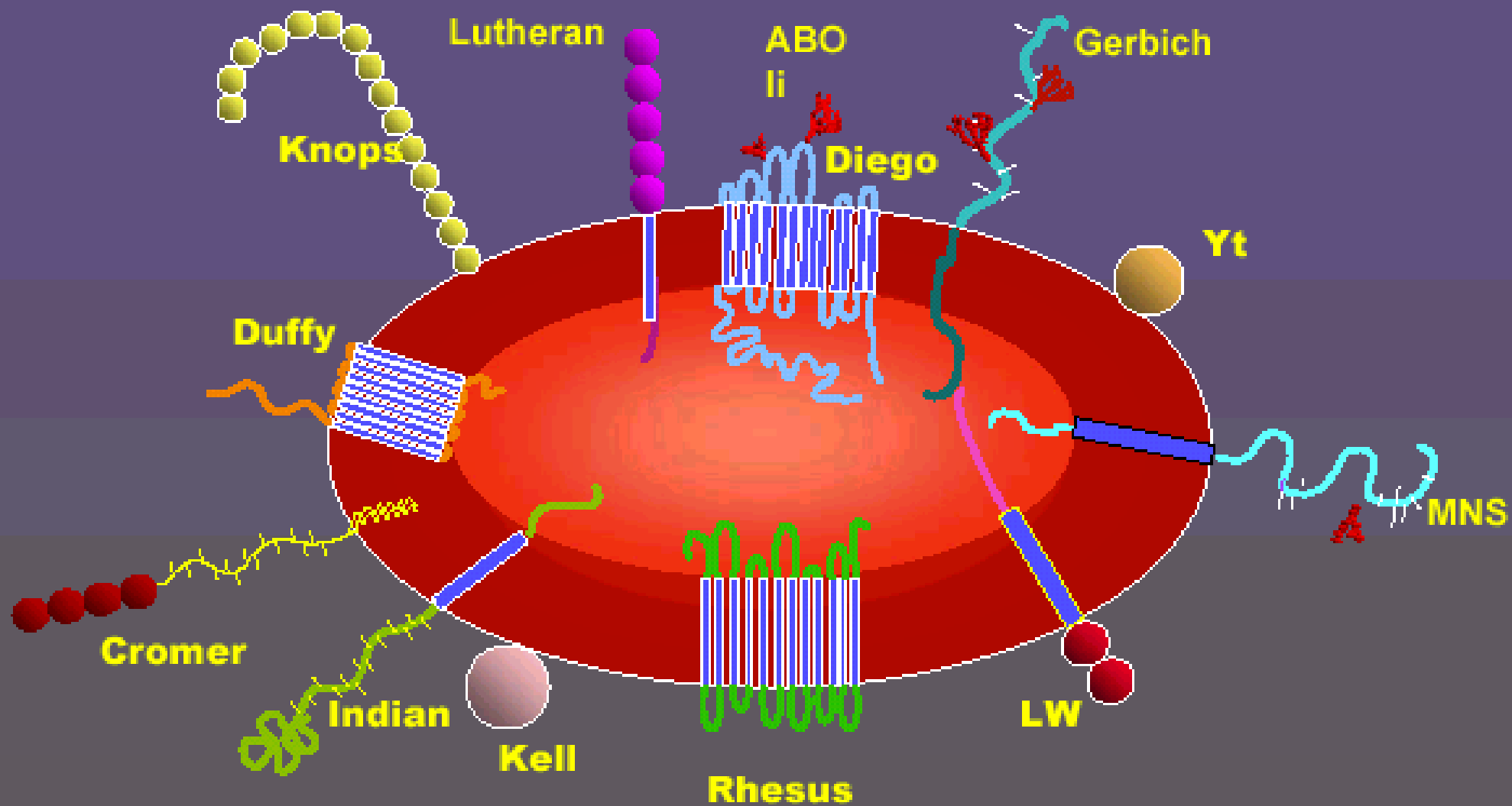
ÚHKT Praha

Workshop „PCR-SSP diagnostika firmy BAG“

IKEM, 11. 9. 2007

Imunohematologie

- obor, zabývající se klinickými a laboratorními aspekty
 - antigenů krevních buněk (zejména erytrocytů z pohledu kompatibility transfuze, erytrocytů a trombocytů z pohledu fetomaternální inkompatibility, leukocytů z pohledu TRALI a HLA systému)
- a
 - imunitního systému (zejména protilátky a komplement /HTR, HON, AIHA/, event. efektorové mechanismy buněčné imunity /funkční testy/)



Slide courtesy of E. Sjöberg-Wester

Antigeny

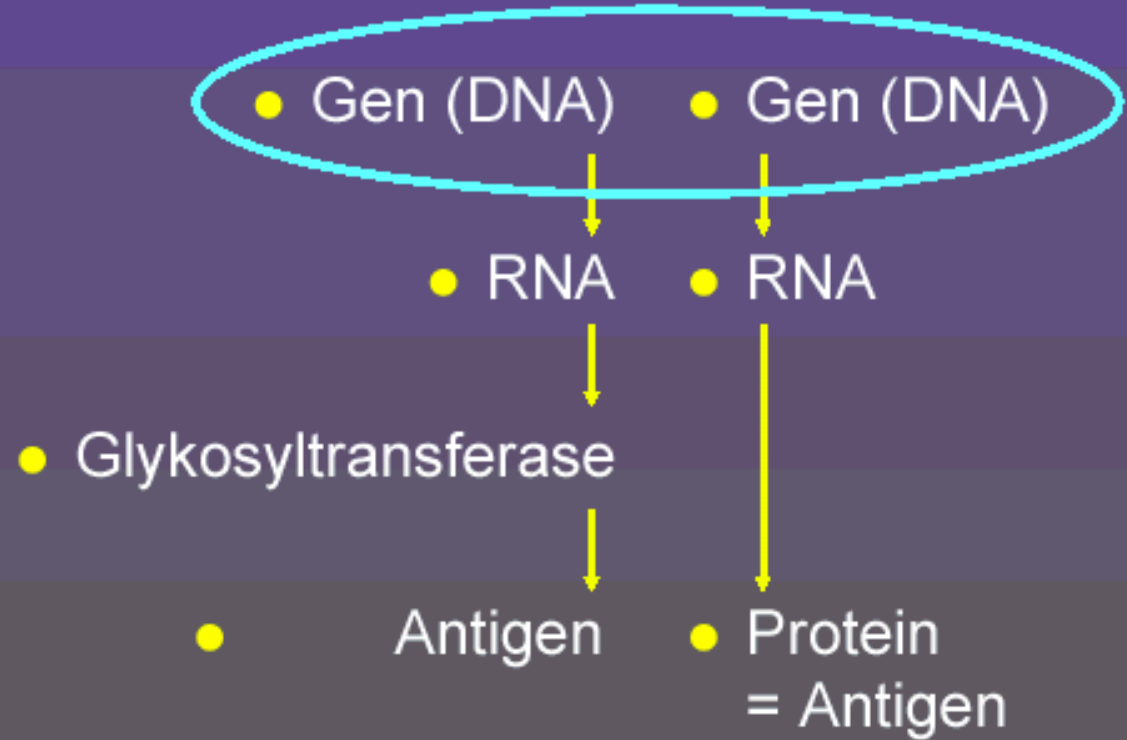
- Struktury membrán krevních buněk, schopné u vnímavého jedince vyvolat reakci imunitního systému
 - **alo-reakce** - odpověď na „ne-vlastní“ antigeny
 - předpokladem je „**odlišnost**“ antigenů příjemce/dárce event. matky/plodu
 - **auto-reakce** - patologická reakce imunitního systému na „vlastní“ antigeny /AIHA/

Molekulární biologie v imunohematologii

- Charakterizuje chemickou podstatu antigenů (buněčná biochemie)

- Identifikuje genetickou podstatu antigenů a umožňuje detekci příslušných alel

Gen ••• Antigen



- Protilátky: identifikace molekulární podstaty specifity a konstrukce „umělých protilátek“

Cukry - glykosylující membránové proteiny a lipidy

(Glyko) Proteiny



Receptory/adhez.molekuly



???

membránový
transport



enzymy



regulace komplementu

Antigeny na cukerné bázi

- Gen (DNA)



- RNA



- Glykosyltransferase



- Antigen

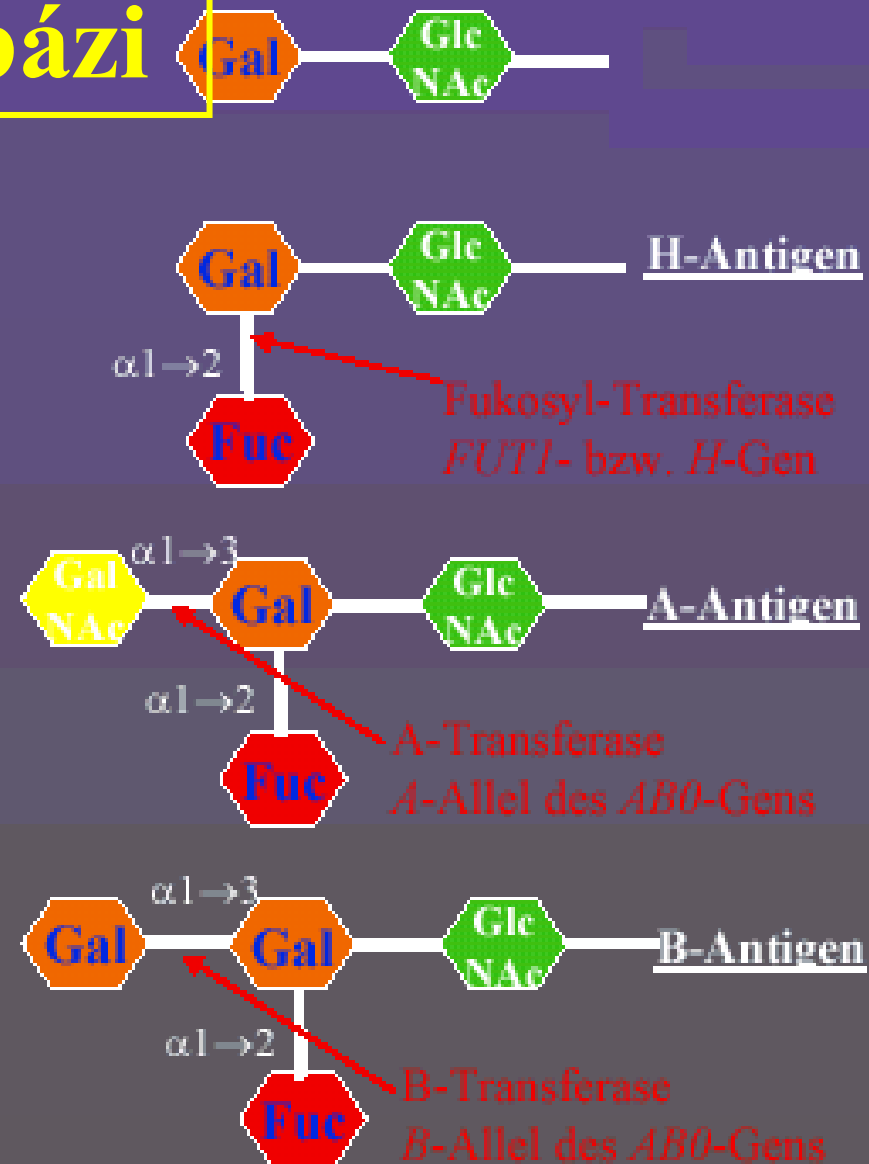
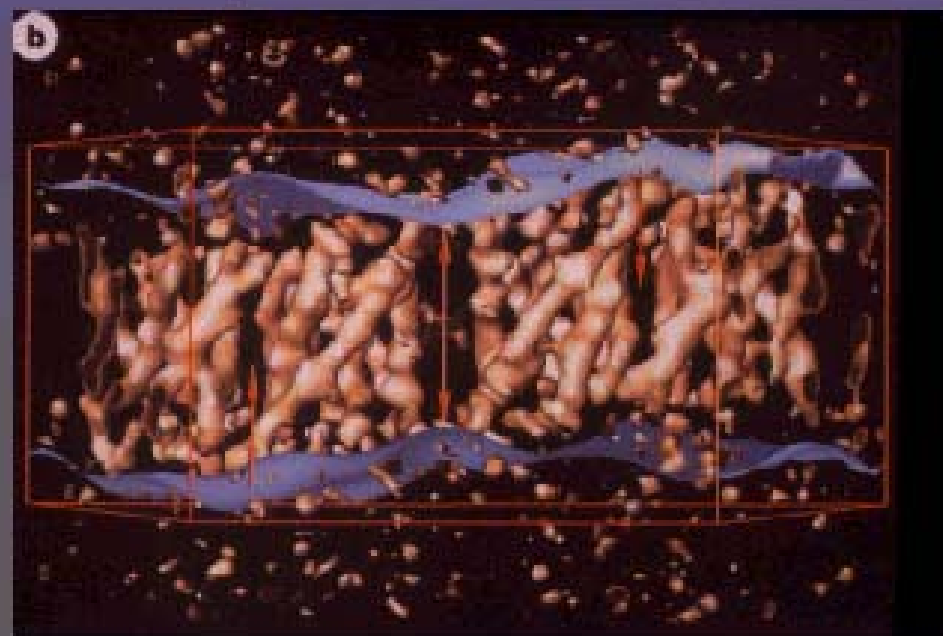
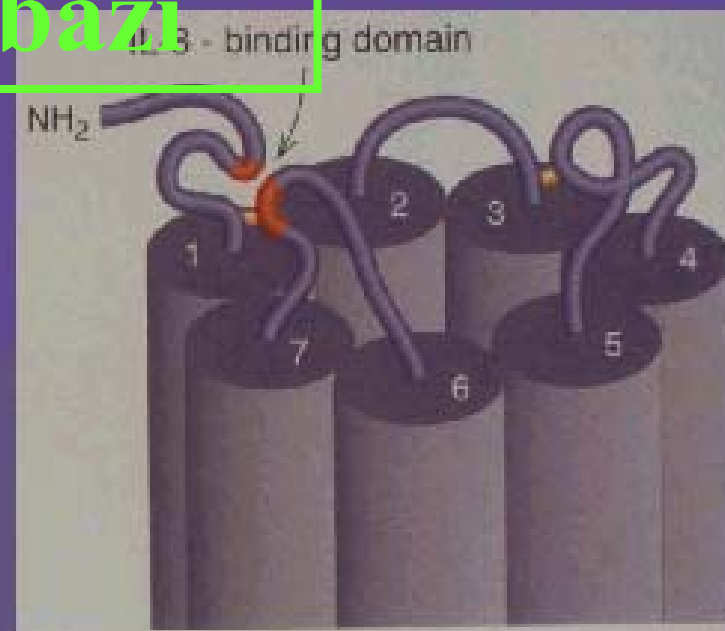


Fig. courtesy of ND Avent 2002

Antigeny na proteinové bázi

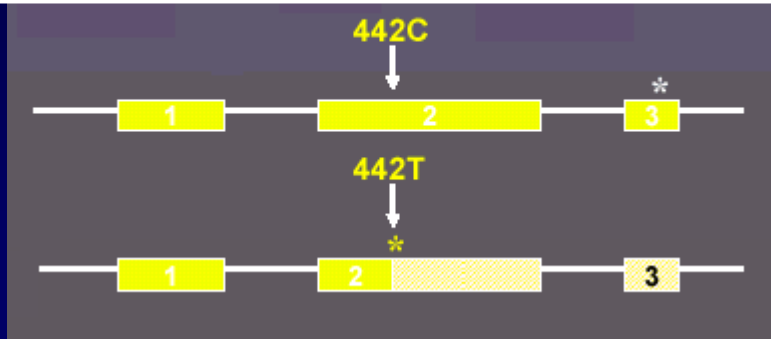
Duffy - Colton

- Gen (DNA)
↓
- RNA
↓
- Protein = Antigen

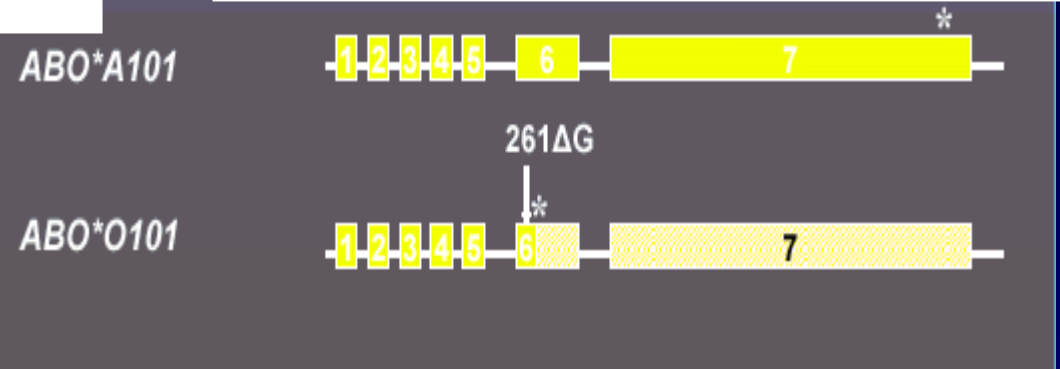


Molekulární mechanismy vzniku rozdílných alel:

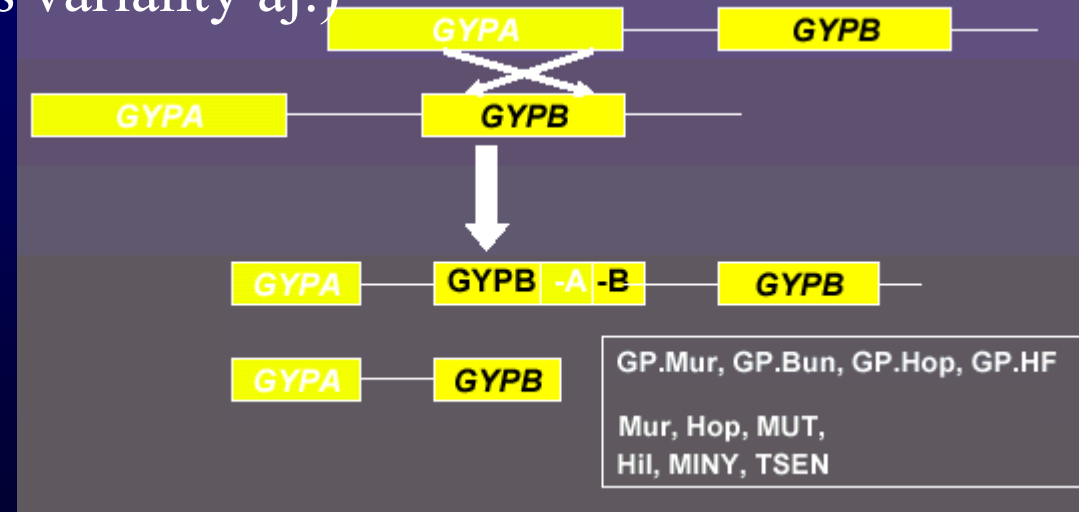
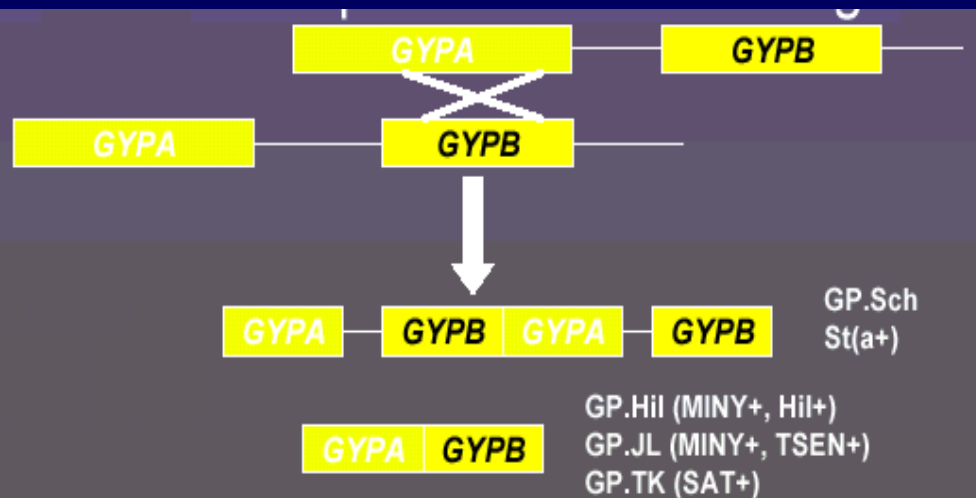
Bodové mutace ... záměna aa (C/c, E/e, Cw, K/k aj.), non-sense“ (Gy(a-) aj.)



Inzerce/delece - „frame-shift“ (0 v systému AB0)



Genové přestavby - delece genu (D-), crossing-over, genové konverze (hybridní geny a proteiny ... Rh a MNSs varianty aj.)



Používané DNA techniky:

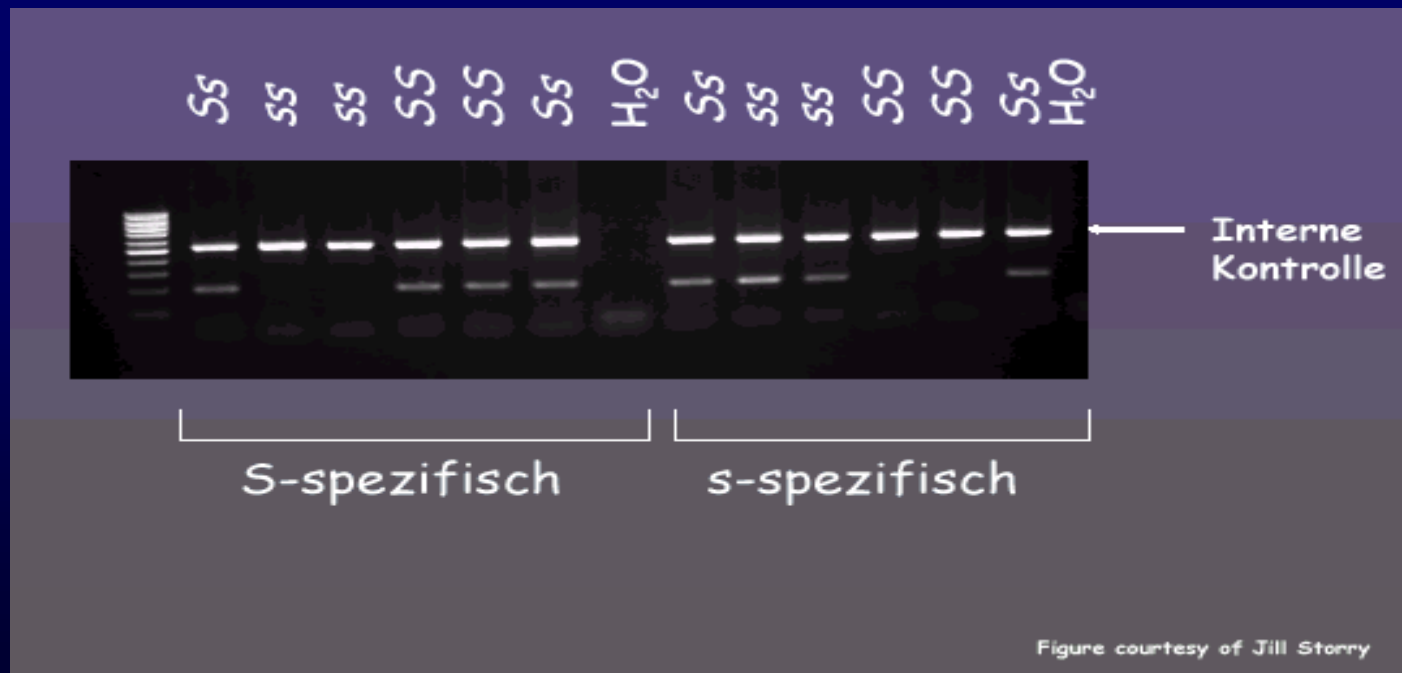
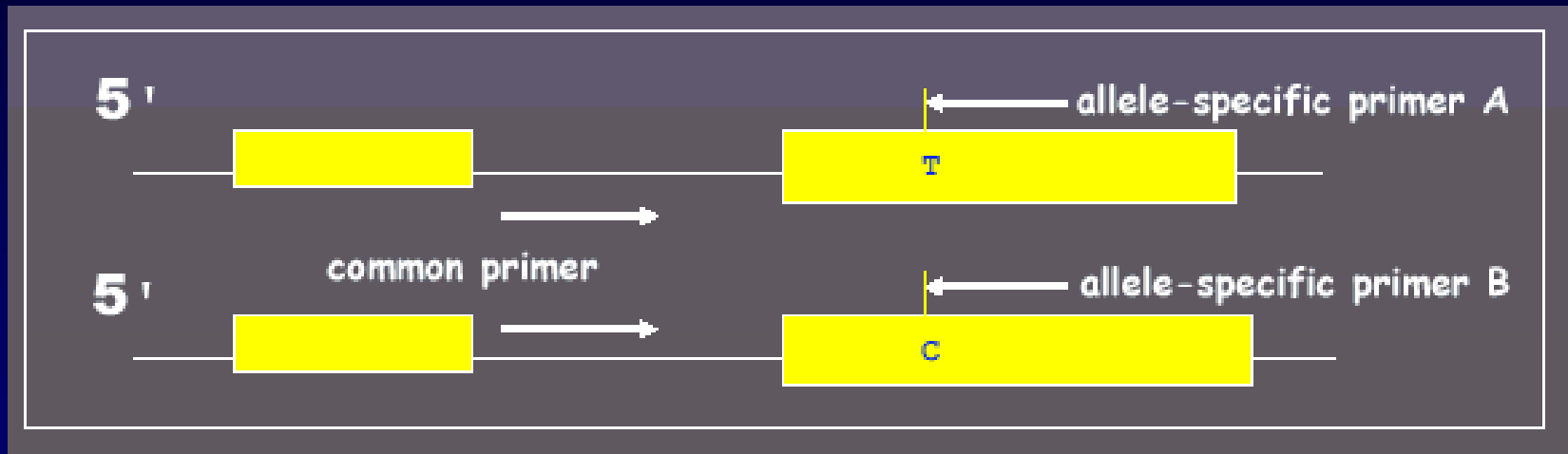
PCR-RFLP

PCR-SSP

PCR-SSO



PCR-SSP (příklad detekce polymorfismu S/s v MNSs systému)



PCR-RFLP (příklad detekce polymorfismu FYA/FYB - Duffy)

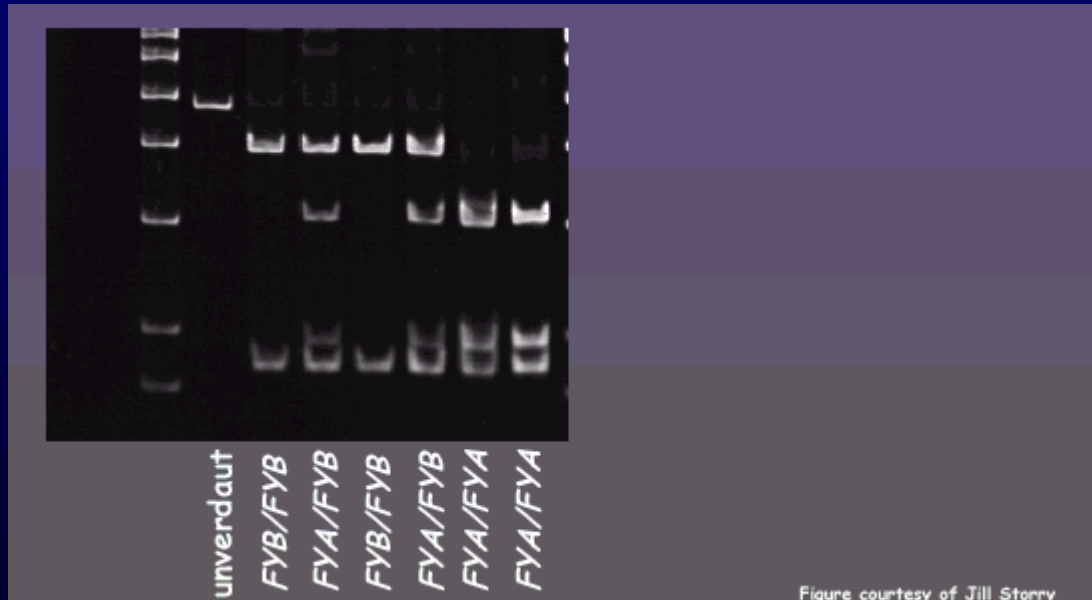
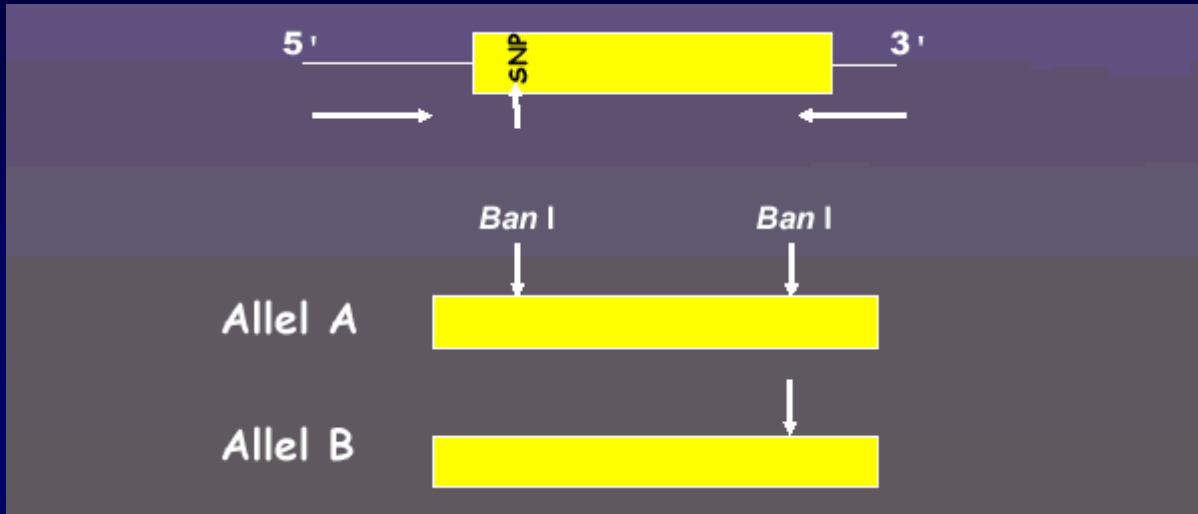
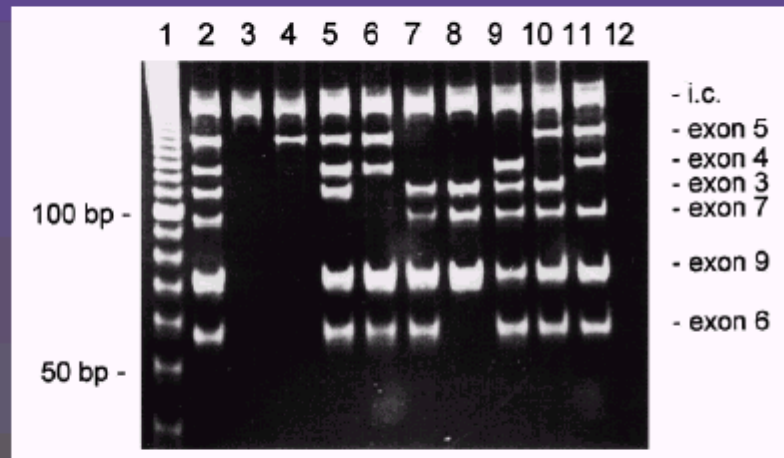


Figure courtesy of Jill Storry

Multiplex PCR

- 2 a více produktů jedné PCR

Exon „scanning“ multiplex PCR

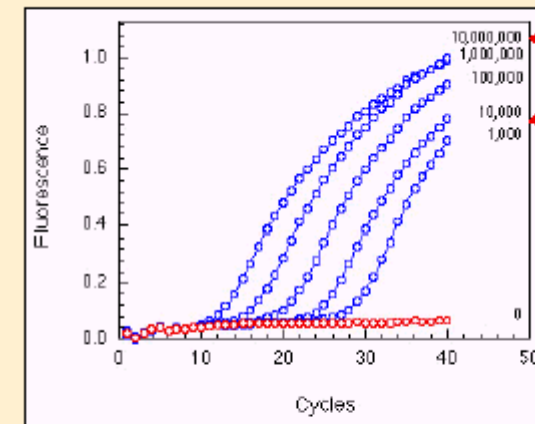


- „The Dutch approach“ Transfusion 38(1998)1015ff

Gel Abbildung in Transfus Med 8(1998)292; courtesy of PA Maaskant-van Wijk

Real-time PCR

- detekce fetální DNA v mateřské plazmě

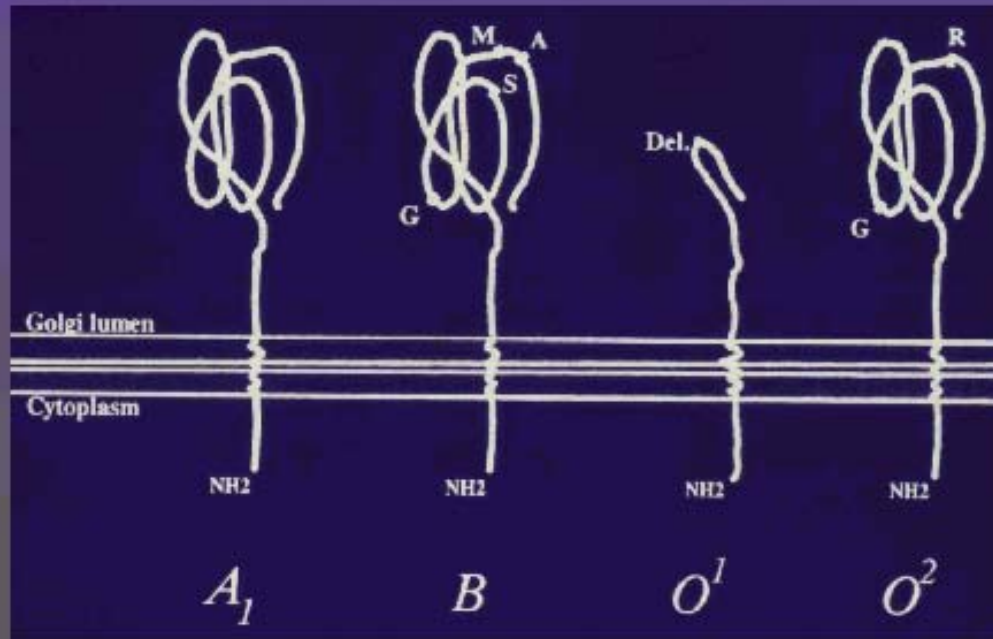


adapted from www.molecular-beacons.com

Současně dostupné PCR kity

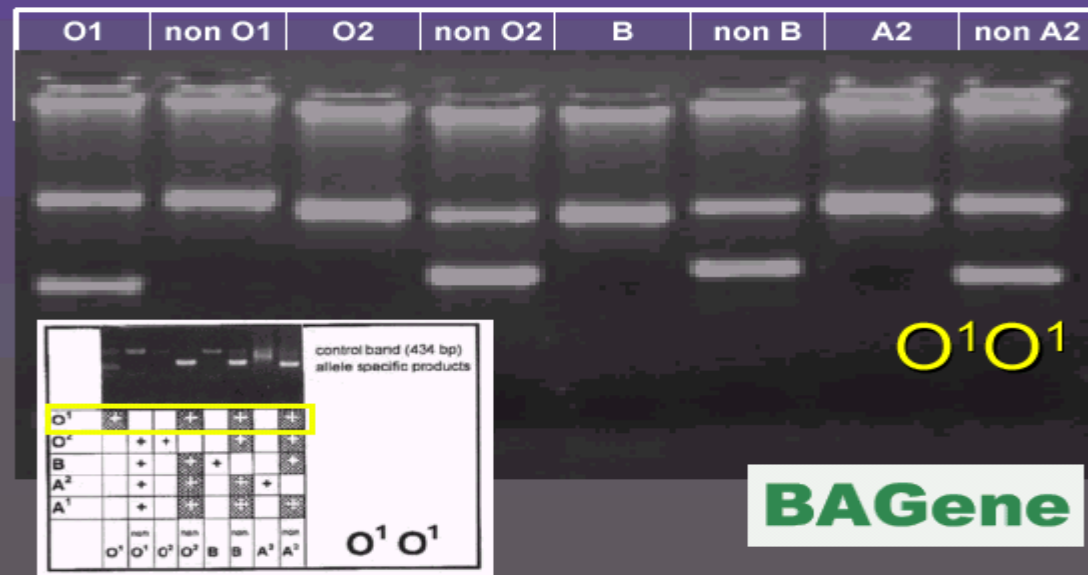
- INNO-TRAIN (dodává BioVendor)
 - AB0-SSP, CDE-SSP, weak-D-SSP, „little“-D-SSP, KKD-SSP, MNS-SSP, HPA-SSP
 - stejné podmínky pro všechny reakce
 - v inovovaných kitech některé reakce „multiplexové“
 - **zatím bez CE značky, tj. „pouze pro výzkum“**
- BAG
 - AB0-TYPE, RH-TYPE, Partial D-TYPE, Weak D-TYPE, D Zygoty-TYPE, HPA-TYPE
 - kromě D Zygoty-TYPE stejné podmínky pro všechny PCR
 - **registrovány jako IVD, mají CE značku ... je tedy možné je používat jako plnohodnotná diagnostika**

ABO transferázy



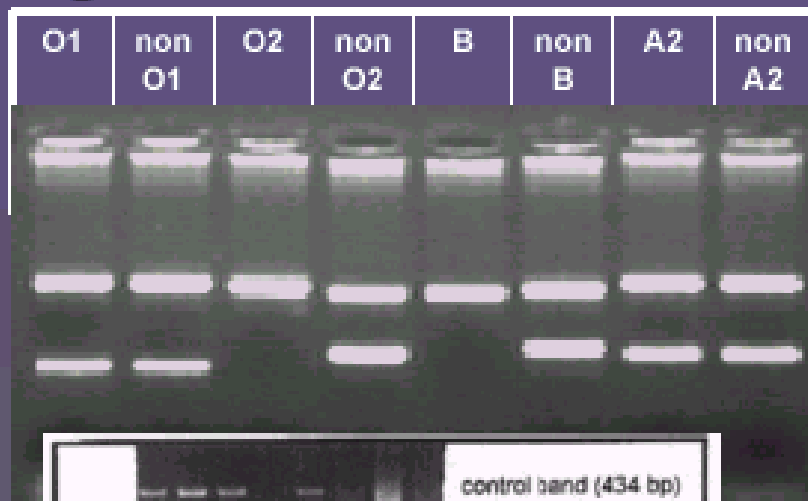
● Grunnet et al. Vox Sang 67(1994)214

ABO-TYPE PCR-SSP (př.1)

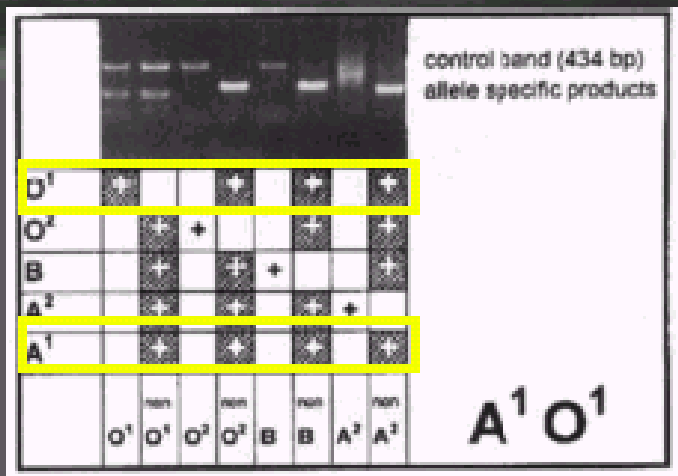
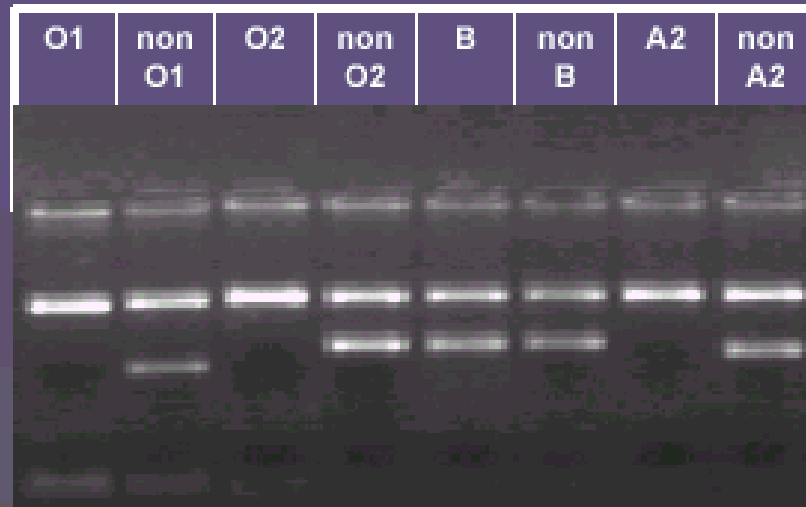


ABO-TYPE PCR-SSP (př.2)

O¹A²



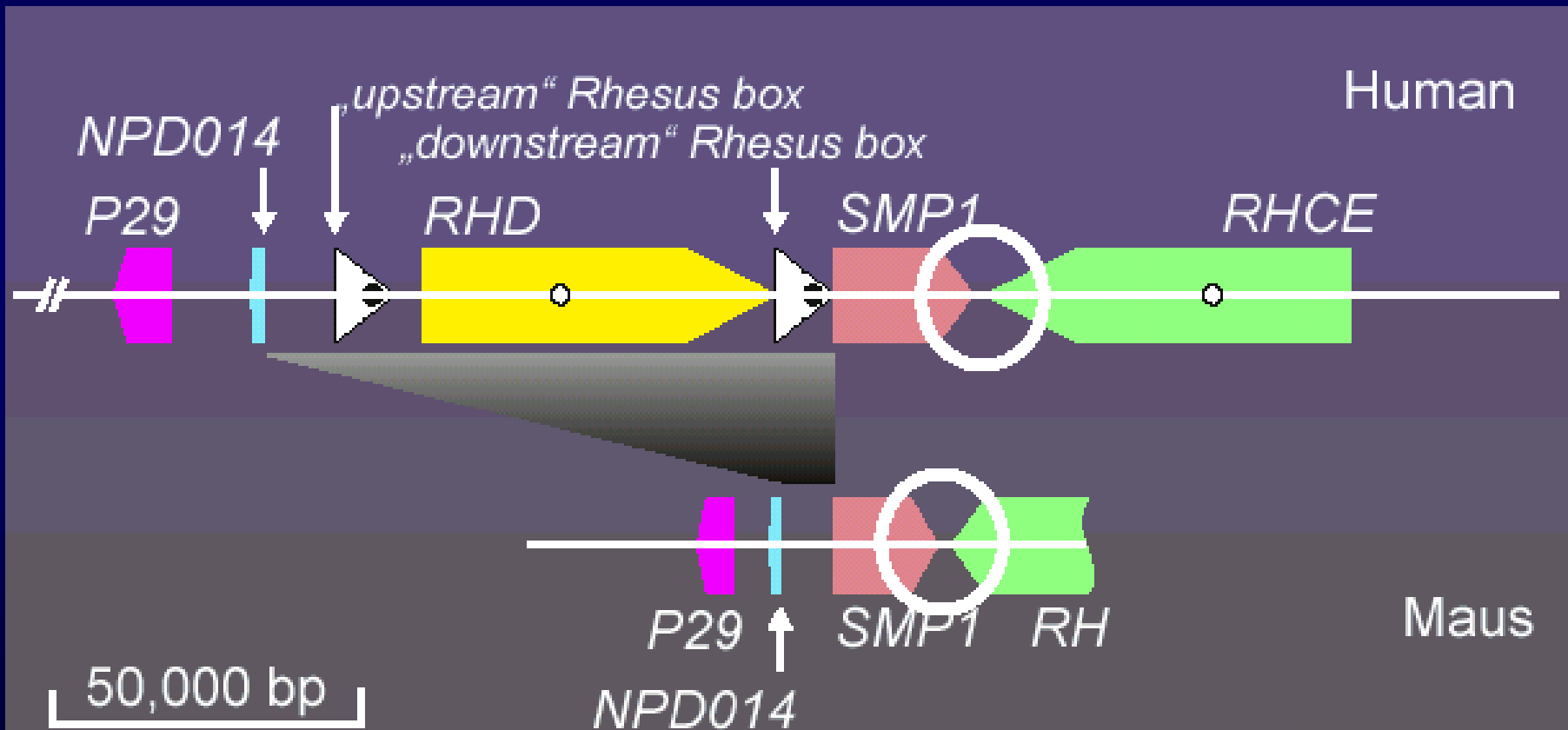
A¹B



BAGene

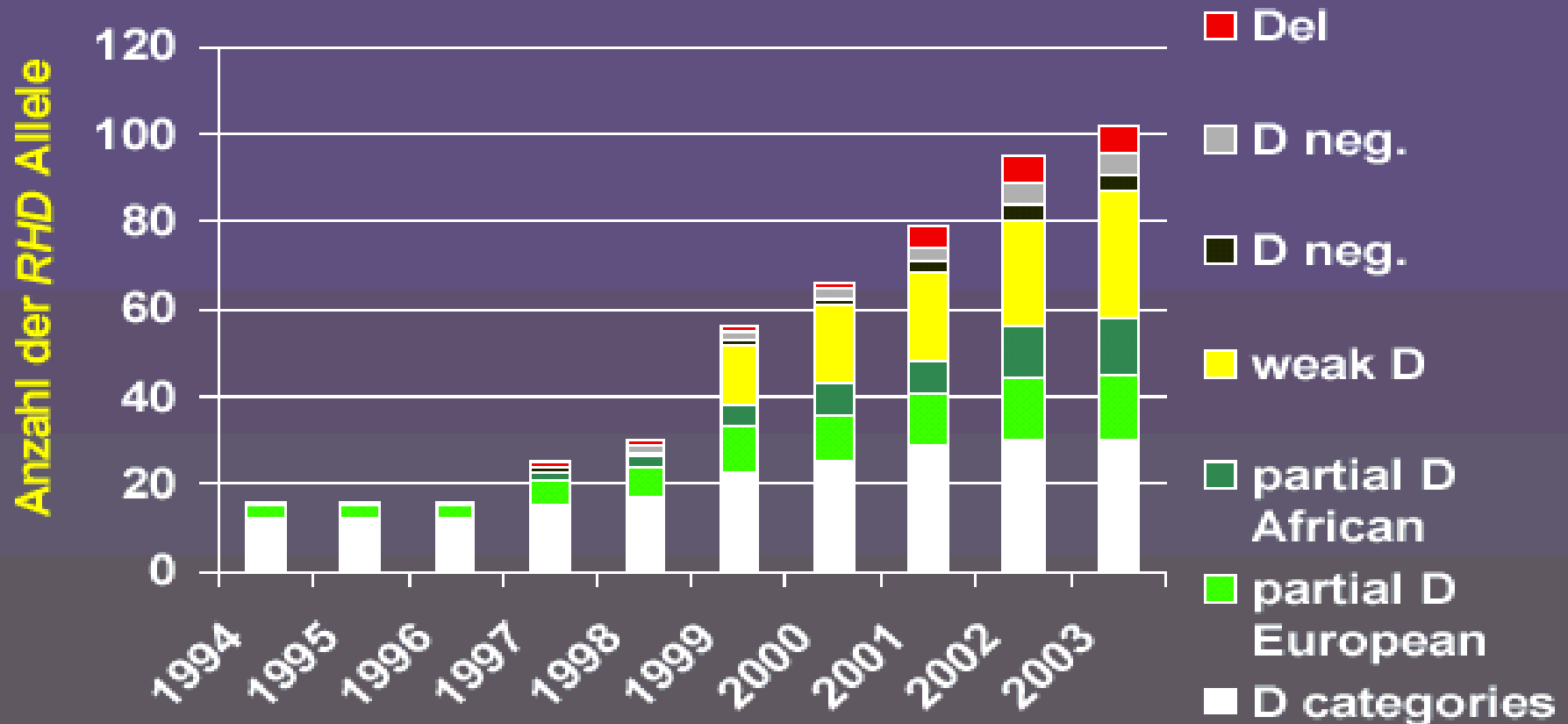
DNA diagnostika v RH systému:

- *RHD* je duplikovaný gen; v kavkazské populaci je u D- delece;
- jiné populace u D- pseudogen a genové přestavby



DNA diagnostika v RH systému:

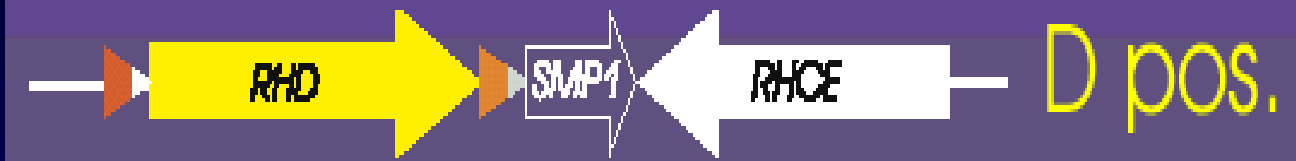
- v posledních letech značný nárůst informací o diverzitě RH systému



nach: The RhesusBase

<http://www.uni-ulm.de/~fwagner/RH/RB/>

D+ haplotyp



D- haplotyp
(kavkazská populace)



D- ... Cde(S)

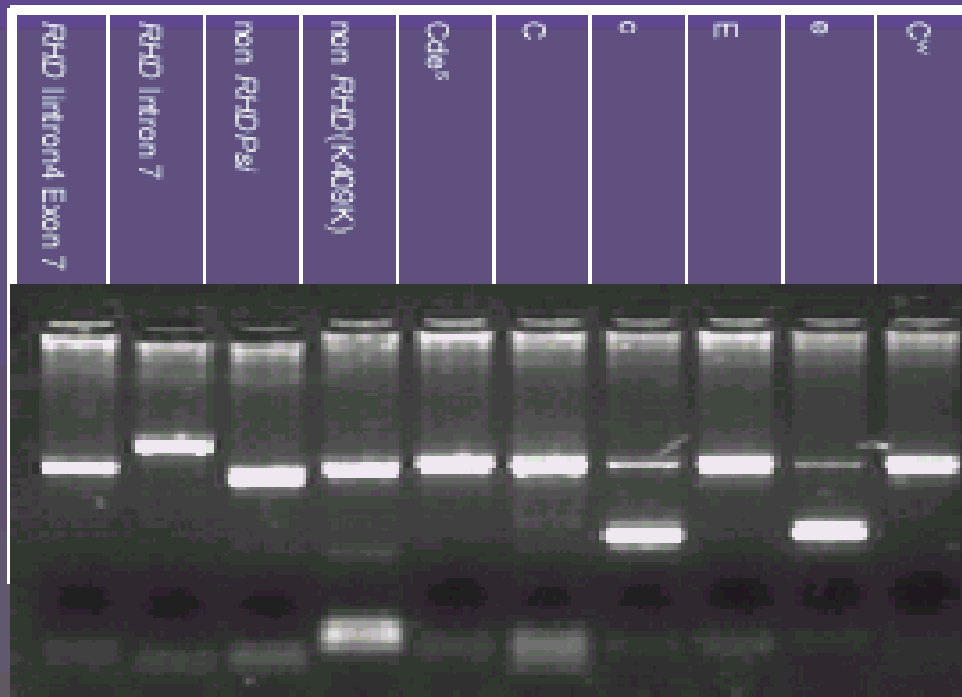


„afro-D- haplotypy“

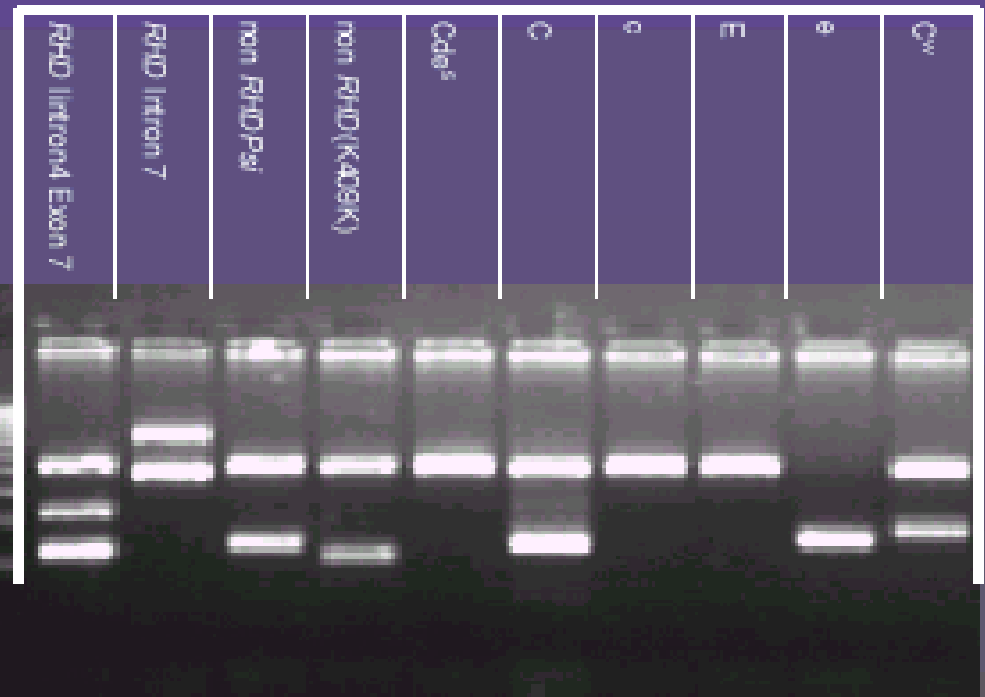
D- ... pseudogen



RH-TYPE PCR-SSP



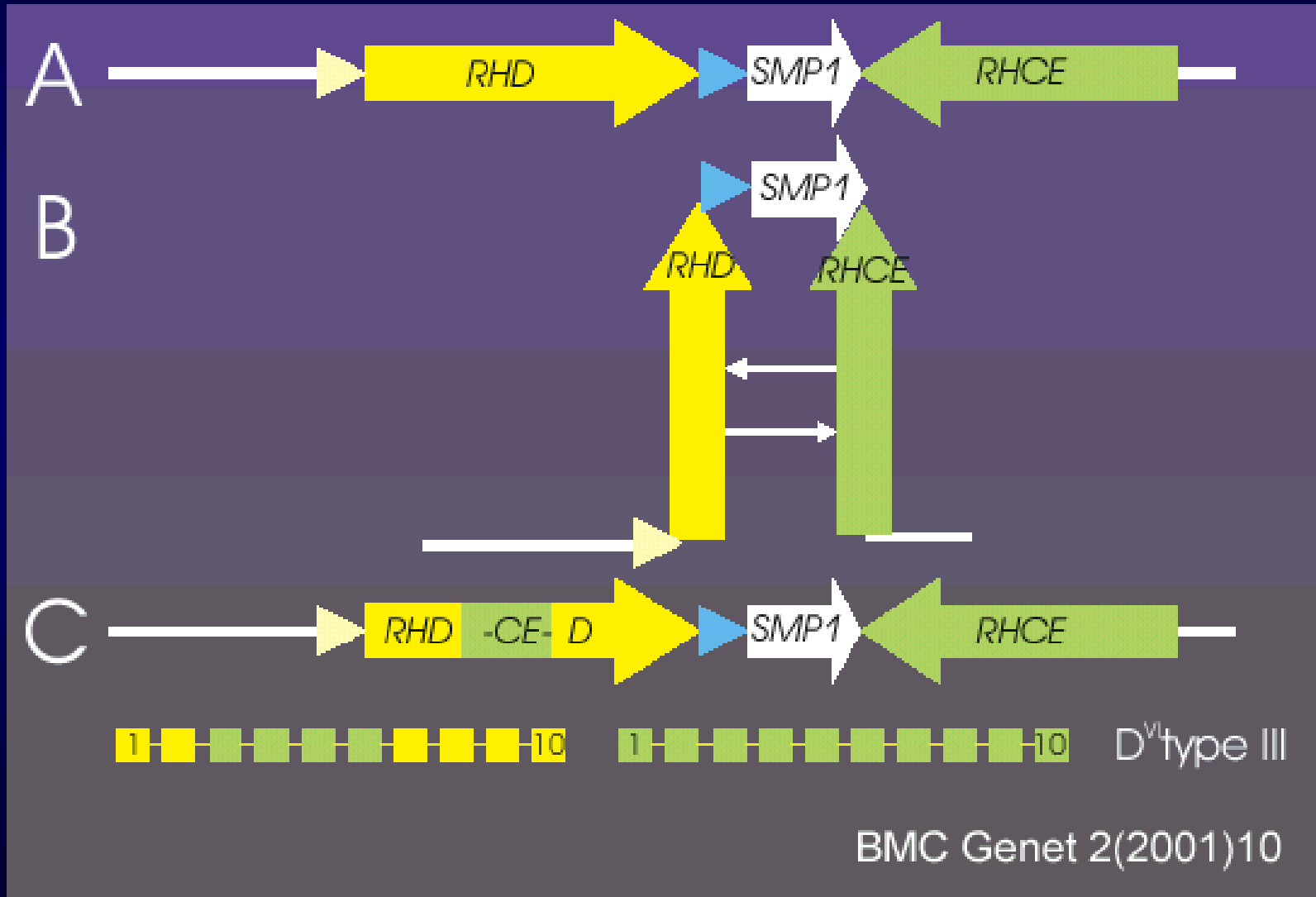
ccddee



CC^wD.ee

BAGene

RhD varianty (= „partial“ D) ... mechanismus vzniku genovou konverzí



Partial D-TYPE PCR-SSP

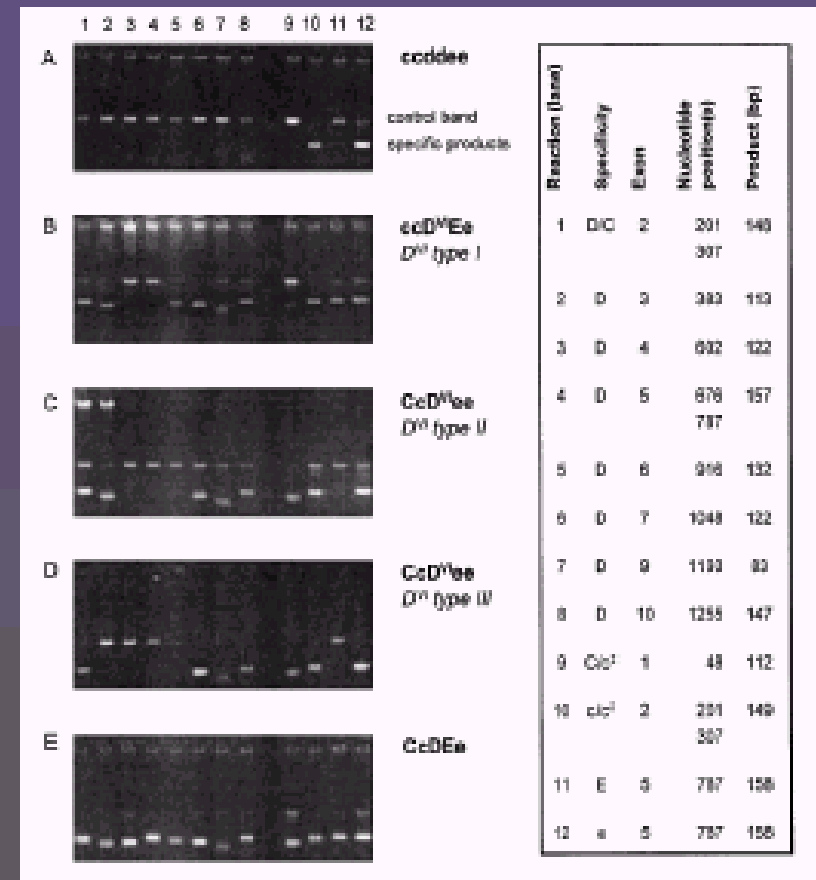
● D Kategorie VI Typ I



● D Kategorie VI Typ II



● D Kategorie VI Typ III



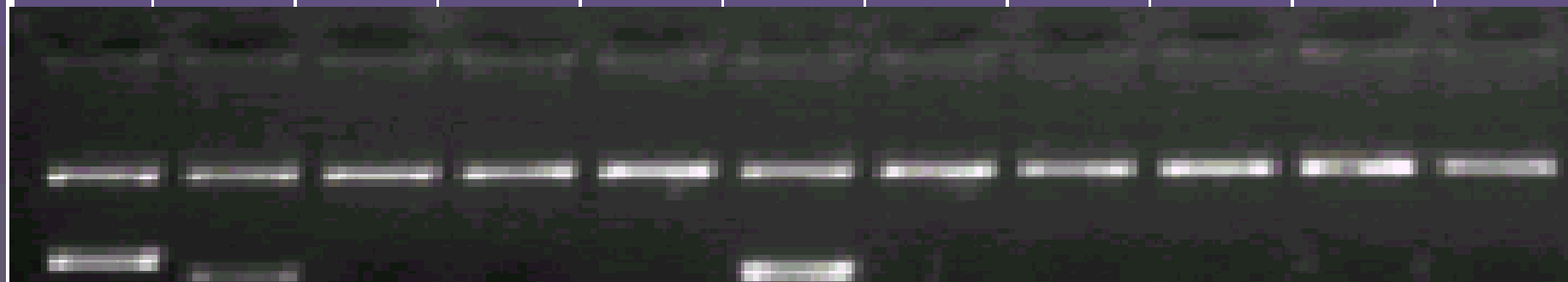
● Blood 91(1998)2175

Partial D-TYPE PCR-SSP

exon-scanning

detekce bodových mutací

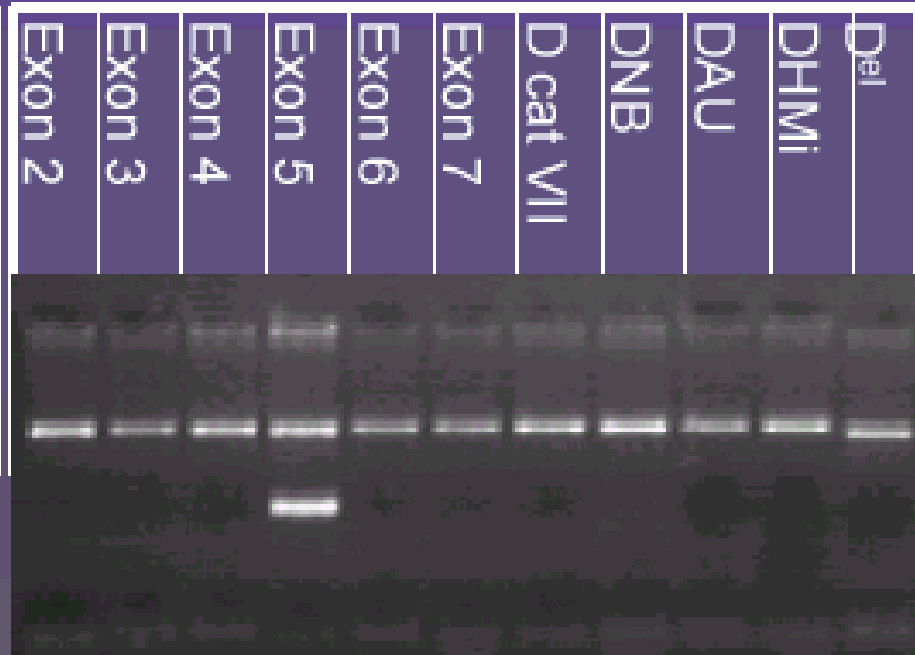
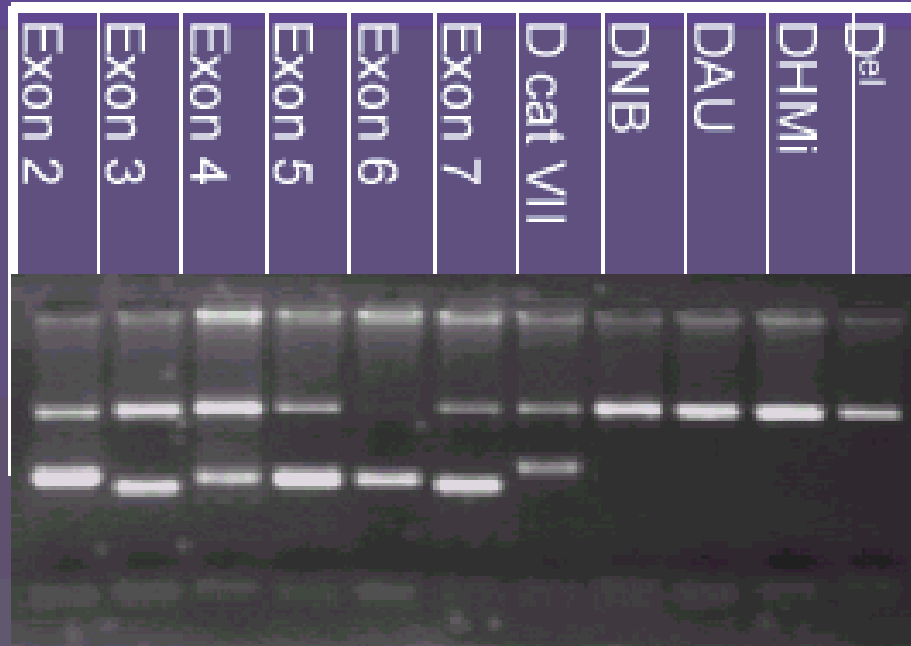
EXON 2	EXON 3	EXON 4	EXON 5	EXON 6	EXON 7	D cat VII	DNB	DAU	DHMI	DeI
--------	--------	--------	--------	--------	--------	-----------	-----	-----	------	-----



D Kategorie VI Typ II

BAGene

Partial D-TYPE PCR-SSP

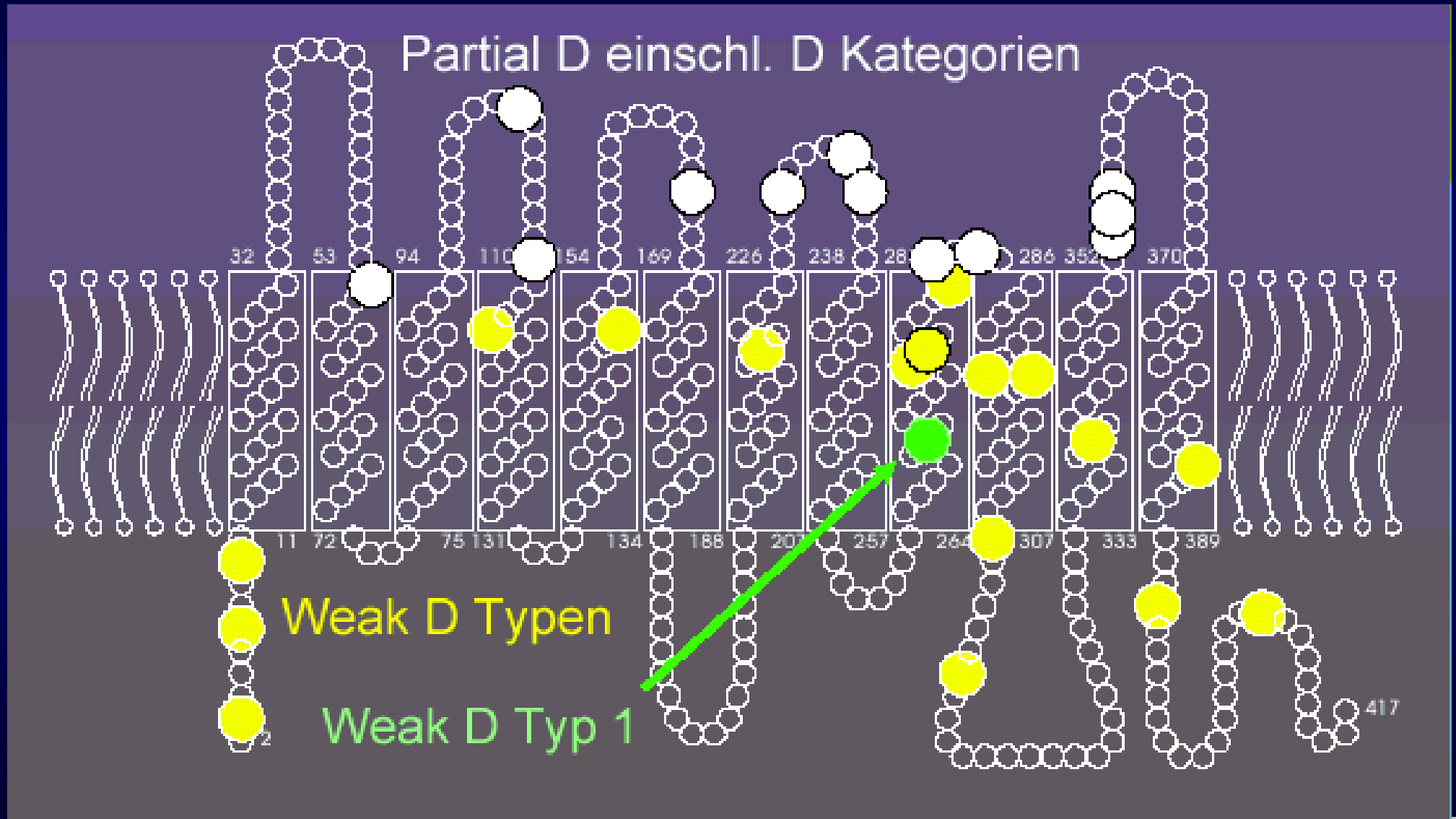


D Kategorie VII

R_0^{Har}

BAGene

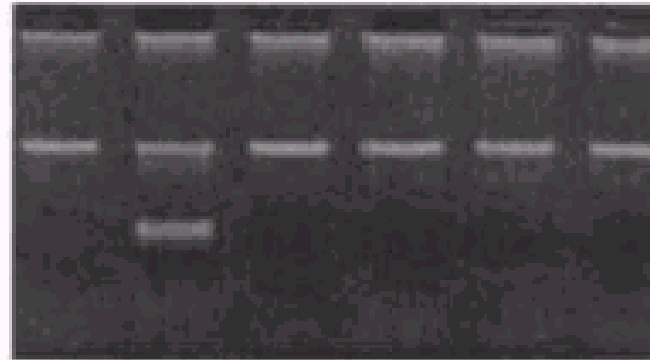
Bodové mutace v *RHD* genu (slabé D a některé D varianty)



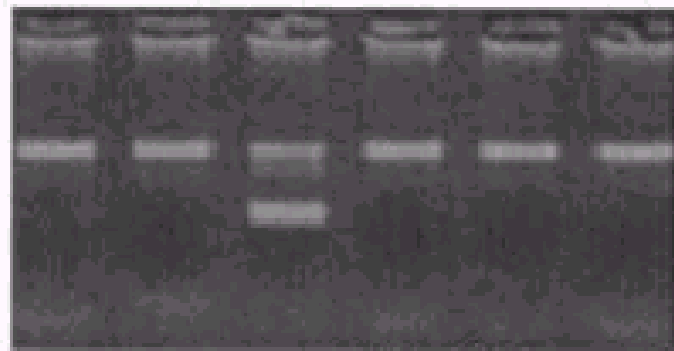
Weak D-TYPE PCR-SSP



Positive reaction 1: **Weak D type 1**



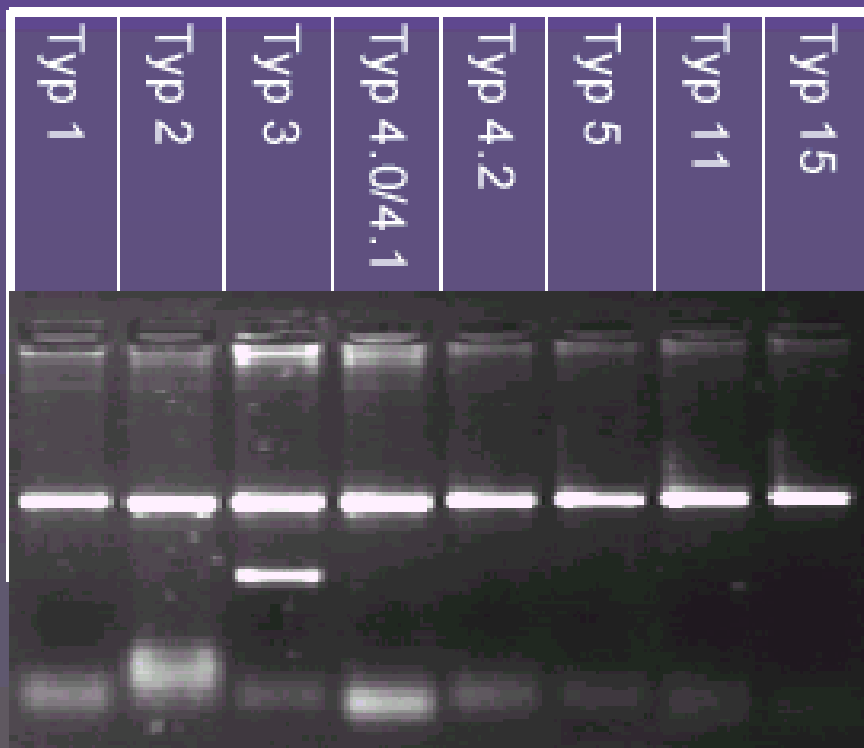
Positive reaction 2: **Weak D type 2**



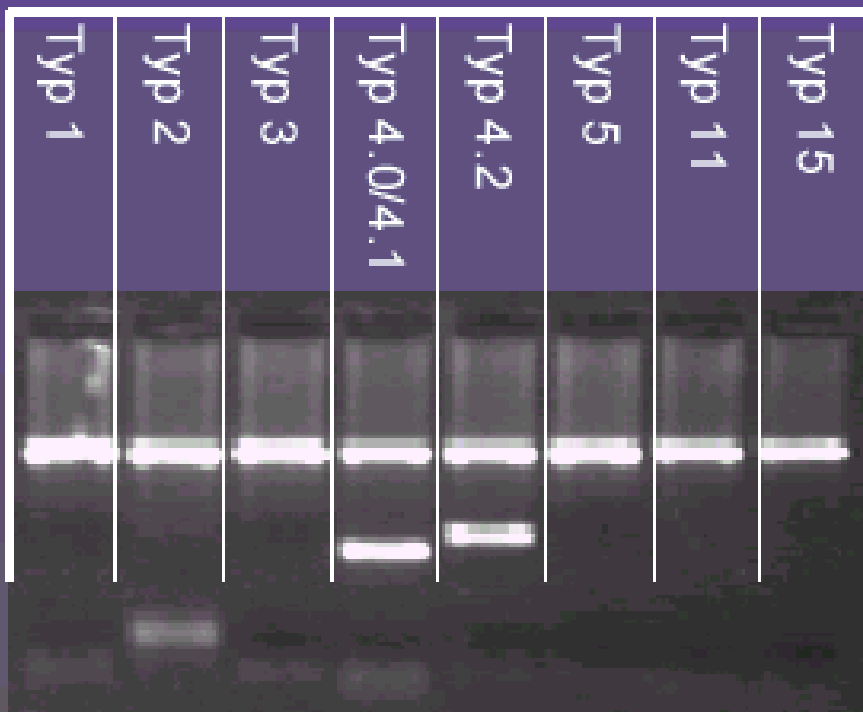
Positive reaction 3: **Weak D type 3**

DNA Isolierung	30 min
PCR Ansatz	10 min/45 min
PCR („cycling“)	90 min
Gel Separation	30 min
Gel Färbung	30 min
Evaluation	<u>10 min</u>
	3,5 – 4 h

Weak D-TYPE PCR-SSP



weak D Typ 3

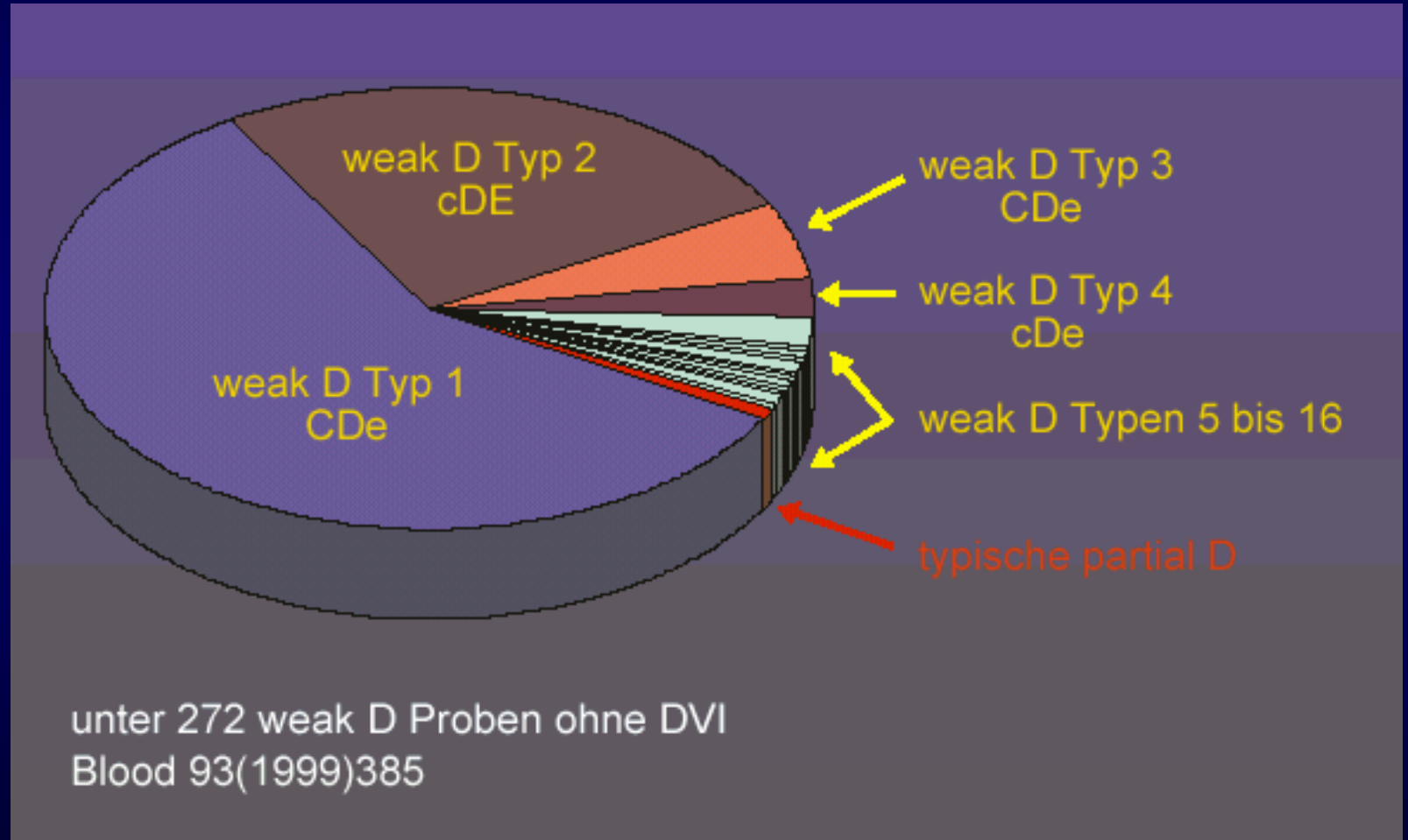


weak D Typ 4.2

BAGene

Praktické využití Weak D-TYPE kitu: pozitivní detekce slabých D u těhotných ... nemusí dostávat anti-D Ig

PCR-SSP cca 50 Euro versus 1 dávka anti-D 100 Euro

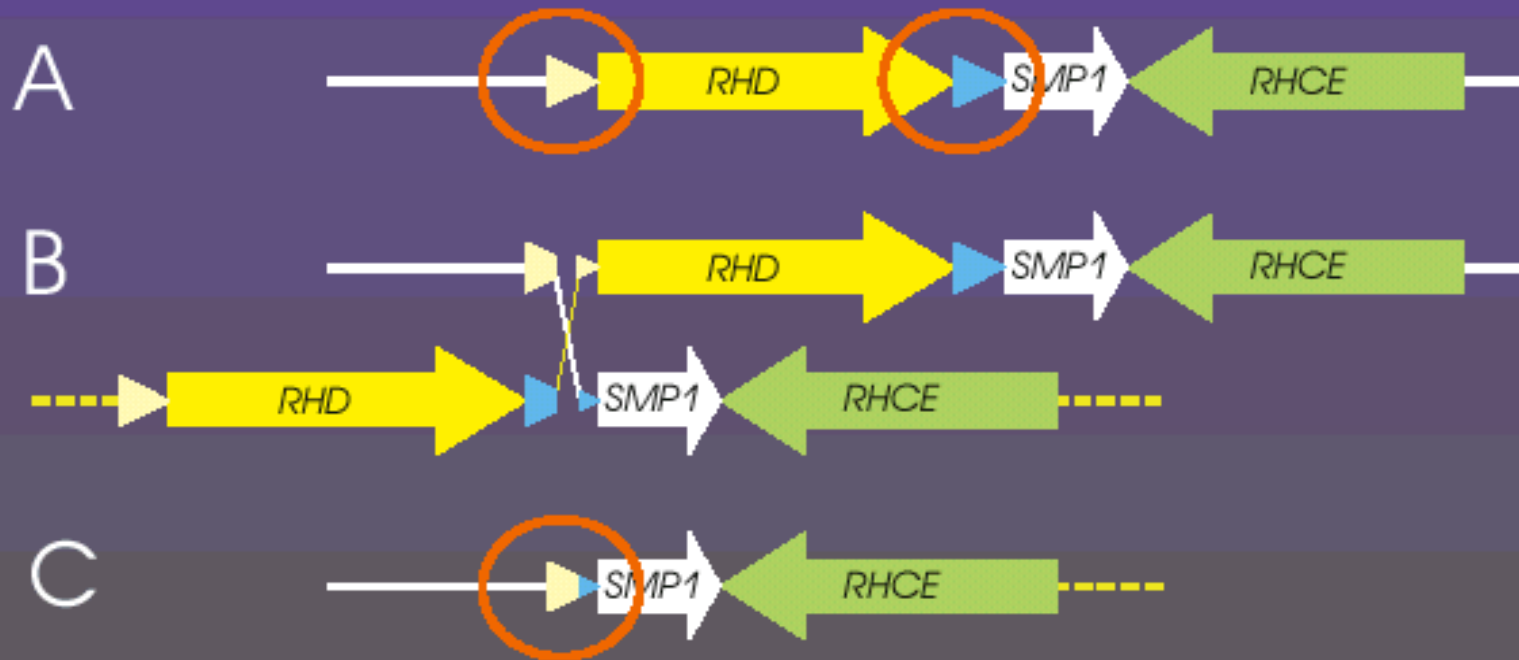


Pozitivní detekce delece *RHD* genu:

průkaz hybridního *Rhesus boxu*

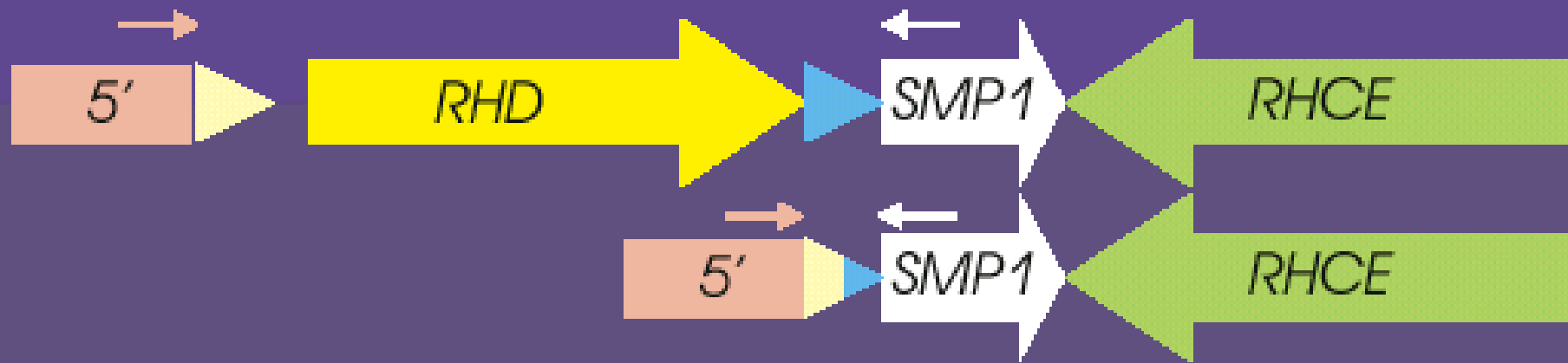
RHD Deletion

Rhesus box Polymorphismus



Blood 95(2000)2272

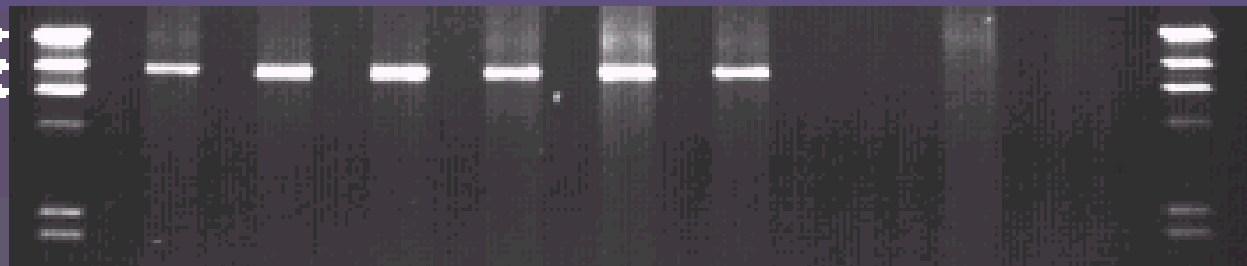
D zygosity-TYPE PCR-SSP



23,130 bp

9,416 bp

6,557 bp



cde/cde

Cde/Cde

cdE/cdE

CDe/cde

cDe/cde

cDE/cde

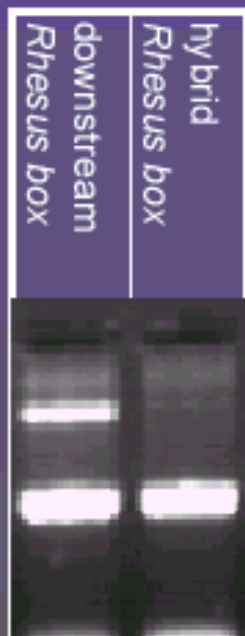
CDe/CDe

CDe/cDE

cDE/cDE

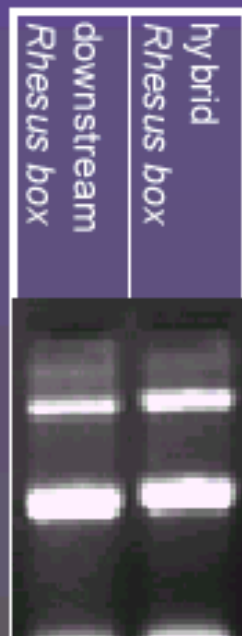
D zygosity-TYPE PCR-SSP

RHD-Genotyp



DD

homozygot



Dd

heterozygot



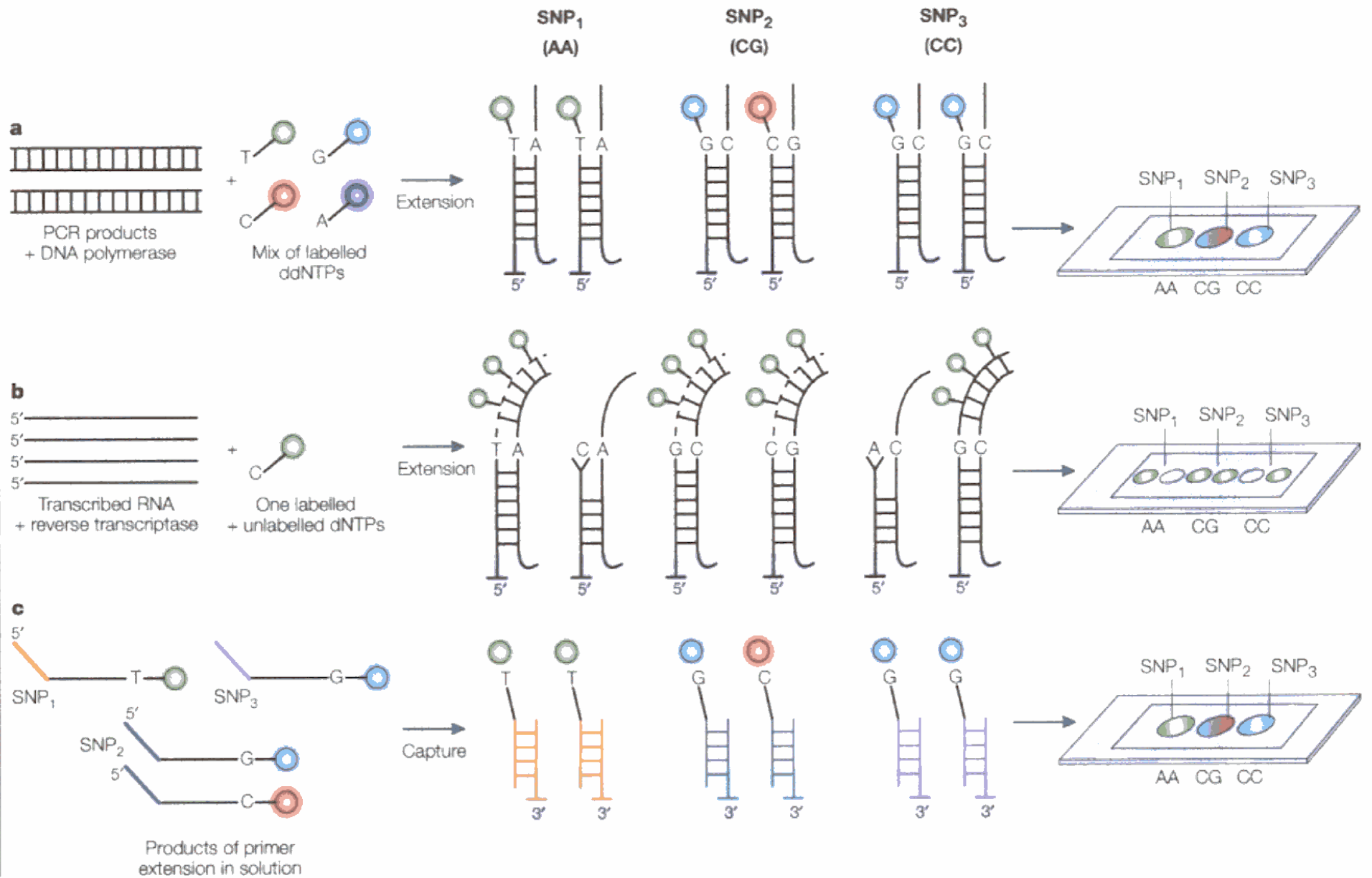
dd

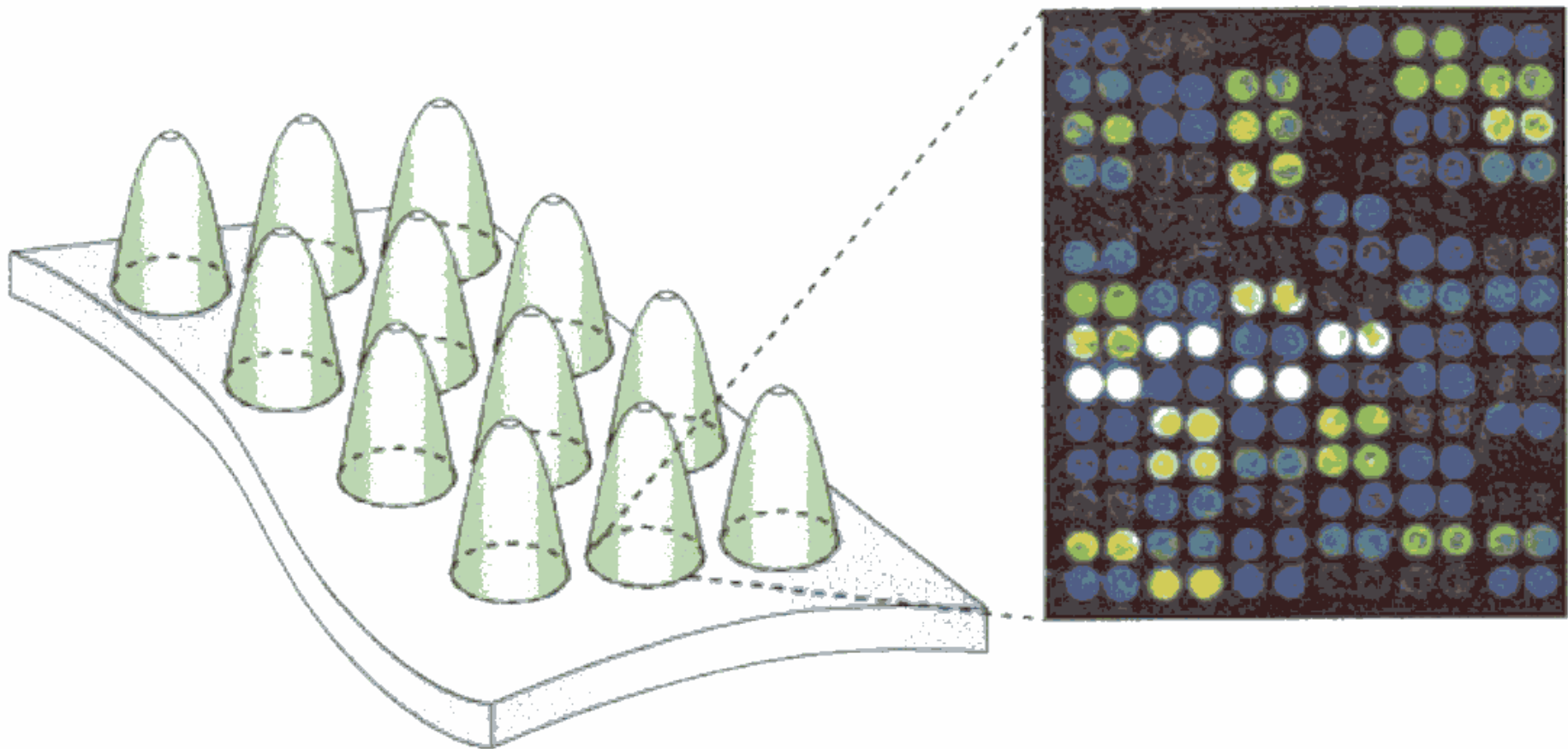
BAGene

Od 9/2003 řešen v Referenční laboratoři pro imunohematologii v ÚHKT

projekt **BLOODGEN**: Improving patient safety and blood transfusion compatibility

- ve spolupráci s pracovišti z Anglie (koordinátor - prof. Avent, UWE, Bristol), Německa, Holandska, Španělska a Švédska získán EU grant
- využití microarray techniky pro detekci polymorfismů všech systémů krevních skupin





HS 400 Hybridization Station Project Goals

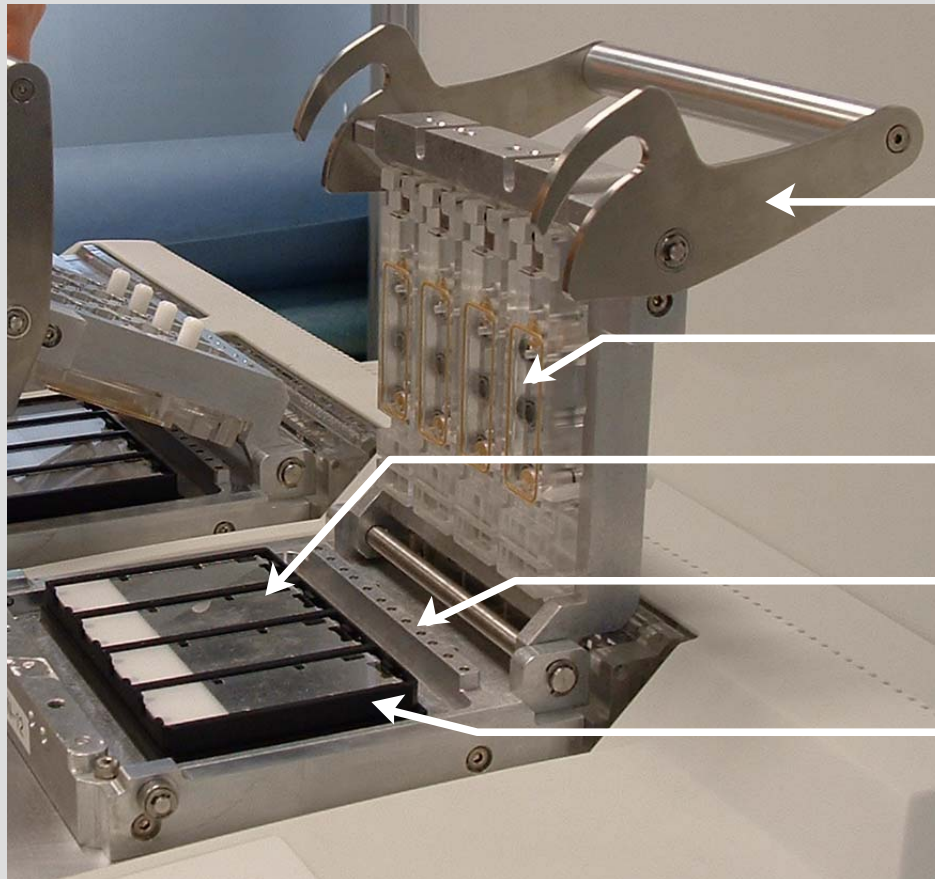
Automated 4-slide hybridization system



Key features:

- > **Small stand-alone instrument with touchscreen control** *or*
- > **Several instruments controlled from one PC**
- > **Processing performance as HS 4800**
- > **Protocol compatibility with HS 4800**
- > **IVD & 21 CFR part 11 compliance**
- > **Competitive price**

Hybridization Module



Closing mechanism

Hybridization chambers

Incubation block (4 – 85°C)

Fluid connections

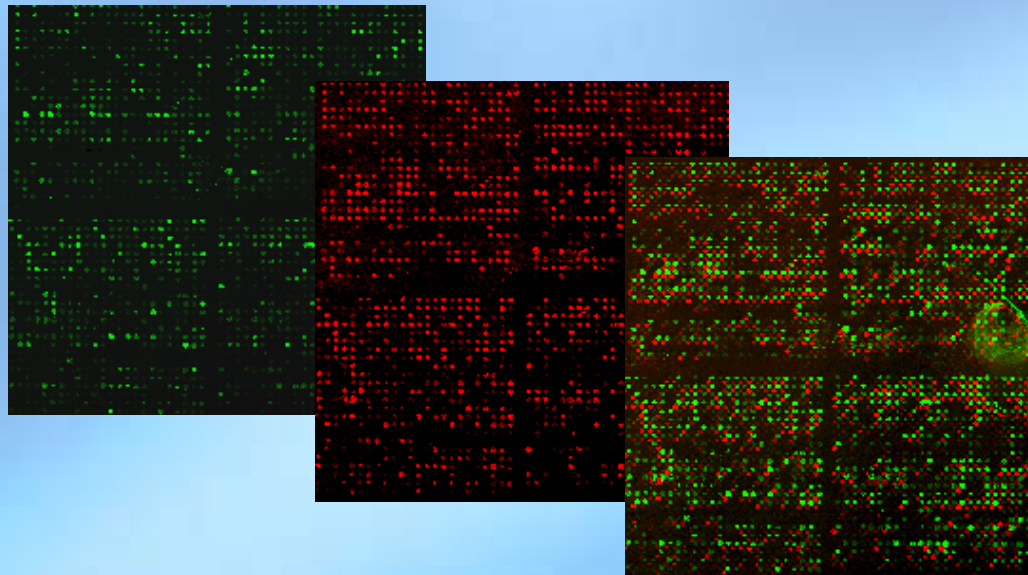
MTP format slide holder for
4 slides

Tecan LSX00 Scanner



Dual Scanning Capability: Speed

2 optional available detection channels and an innovative scanning mechanism result in a measurement time of **less than 3 minutes per full slide.**



LSx00 Laser Scanner Unmatched Flexibility

