



ÚVN

ÚSTŘEDNÍ VOJENSKÁ NEMOCNICE
Vojenská fakultní nemocnice Praha

Oddělení hematologie a krevní transfuze

Ludmila Landová



BioArray™ HEA Beadchip DNA Typing kit

Stanovení krevně skupinových znaků u dárců krve pomocí metody PCR

Stanovení krevně skupinových znaků u dárců krve pomocí metody PCR

DNA základ většiny důležitých krevně skupinových antigenů je znám již mnoho let

Do nedávné doby bylo použití krevně skupinových testů založených na principu DNA analýzy většinou omezeno na referenční laboratoře podporující hluboké zkoumání relativně malého počtu případů.

Tyto PCR metody zahrnují:

Sequence-Specific Priming (SSP)

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

DNA sequencing a Real Time PCR

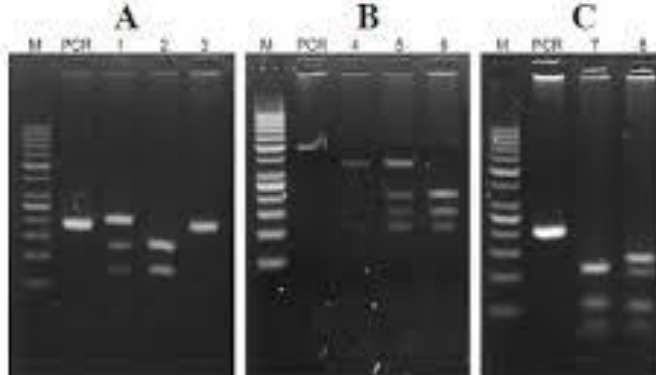
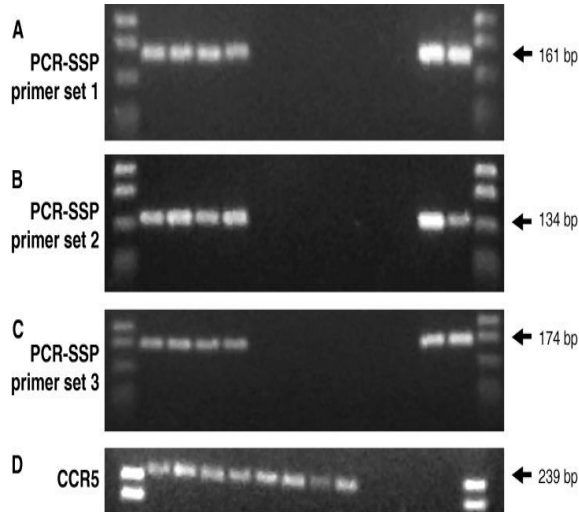


Figure 1 - polymerase chain reaction (PCR) restriction fragment length polymorphism (RFLP) electrophoresis gels
A. *KEL*1/KEL*2* genotyping where sample in lane 1 was genotyped as *KEL*1/KEL*2*, in lane 2 as *KEL*1/KEL*1*, and in lane 3 as *KEL*2/KEL*2*
B. *KEL*3/KEL*4* genotyping where sample in lane 4 was genotyped as *KEL*4/KEL*4*, in lane 5 as *KEL*3/KEL*4*, and in lane 6 as *KEL*3/KEL*3*
C. *KEL*6/KEL*7* genotyping where sample in lane 7 was genotyped as *KEL*7/KEL*7* and in lane 8 as *KEL*6/KEL*7*
M identifies the 50 bp molecular marker and PCR identifies PCR products

A

1
2 3
MWSTRSPNSTAWPLSLEPDPGMASASTTMHTTTIA
EPDPGMSGWPDGRMETSTPTIMDIVVIAGVIAAVAIVL
4
VSLLFVMLRYMYRHKGTYHTNEAKGTEFAESADAA
LQGDPALQDAGDSSRKEYFI

B

1 2 3 4 K-I
PfeBP-2 →

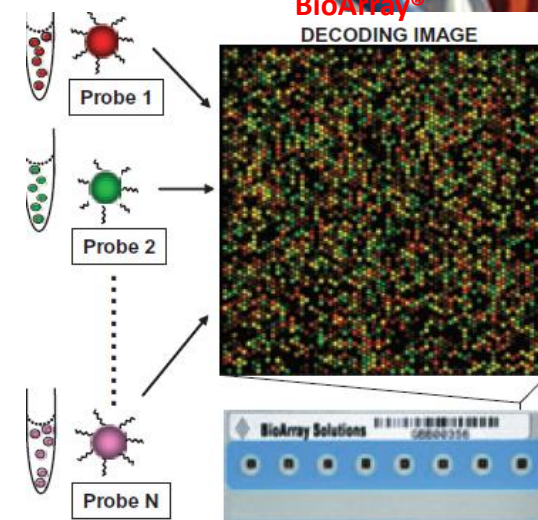
C

NMS
EBP-2-3

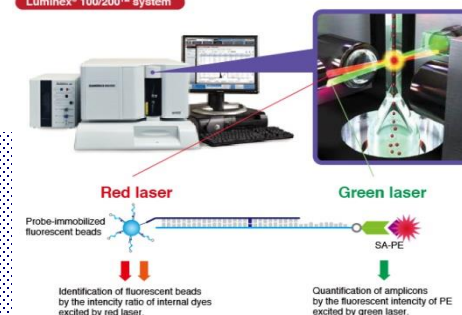
Multiplex testing

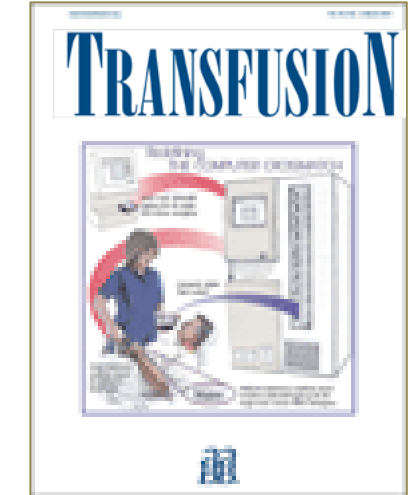
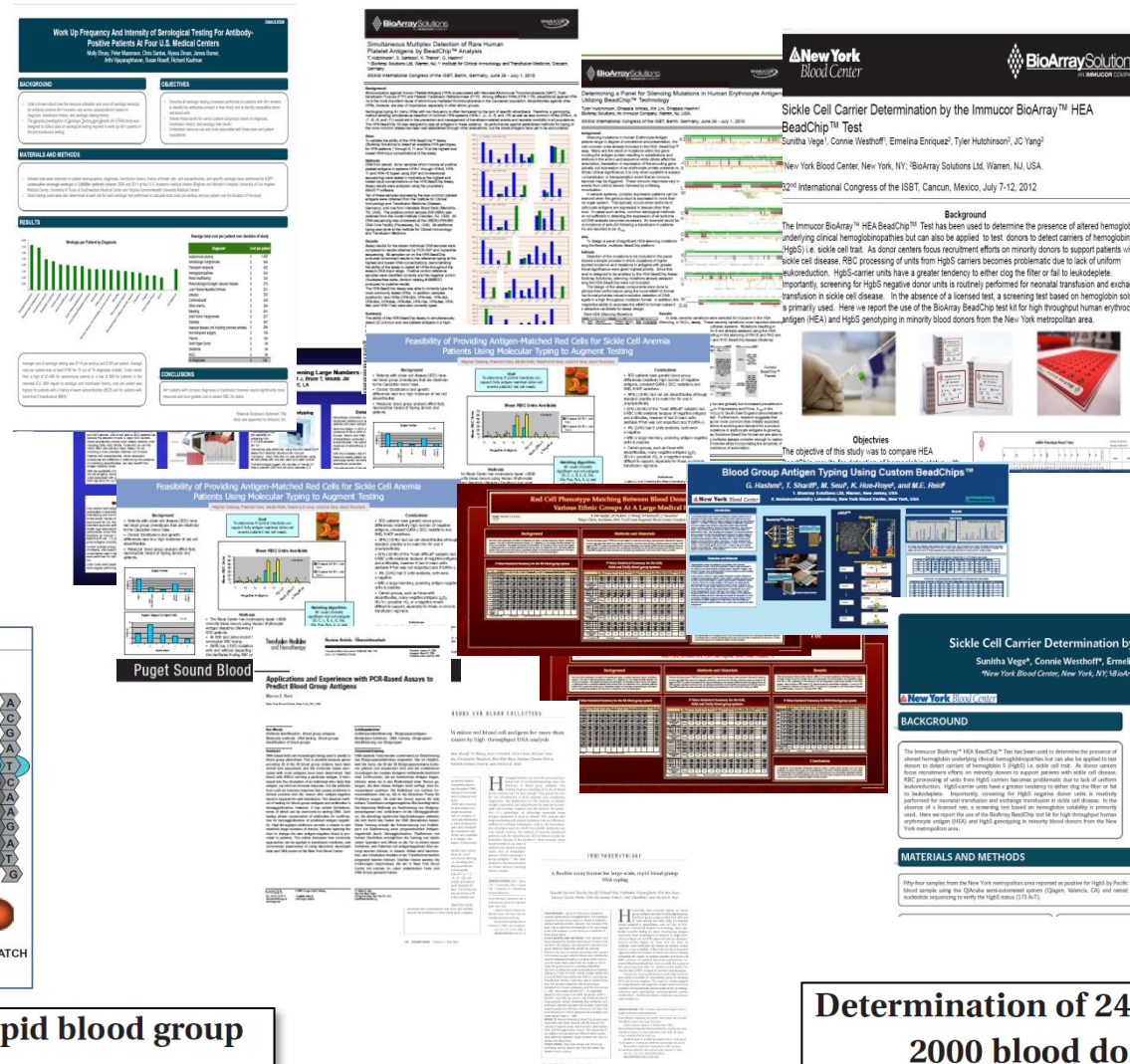
BioArray®

DECODING IMAGE

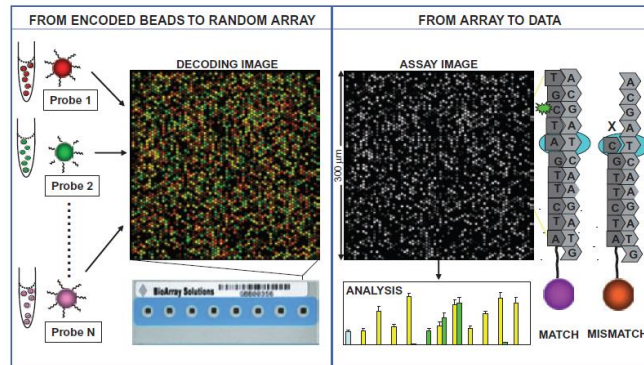


Luminex® xMAP...





736 TRANSFUSION Volume 47, April 2007



Determination of 24 minor red blood cell antigens for more than 2000 blood donors by high-throughput DNA analysis

Ghazala Hashmi, Tasmia Shariff, Yi Zhang, Joan Cristobal, Chiu Chau, Michael Seul, Prabhakar Vissavajhala, Christopher Baldwin, Kim Hue-Roye, Dalisay Charles-Pierre, Christine Lomas-Francis, and Marion E. Reid

3 hlavní komponenty BioArray

BioArray BeadChip Assays



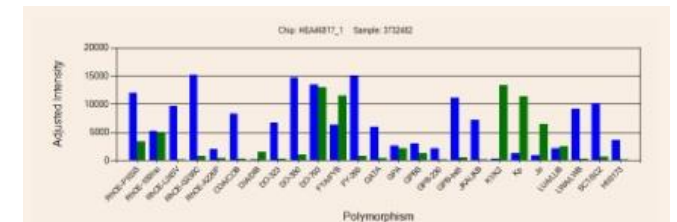
- **Kity dostupné v konfiguraci 8-čipového stripu nebo 96-čipové desky**
- **Obsahují všechny potřebné reagentie**

Array Imaging System (AIS)

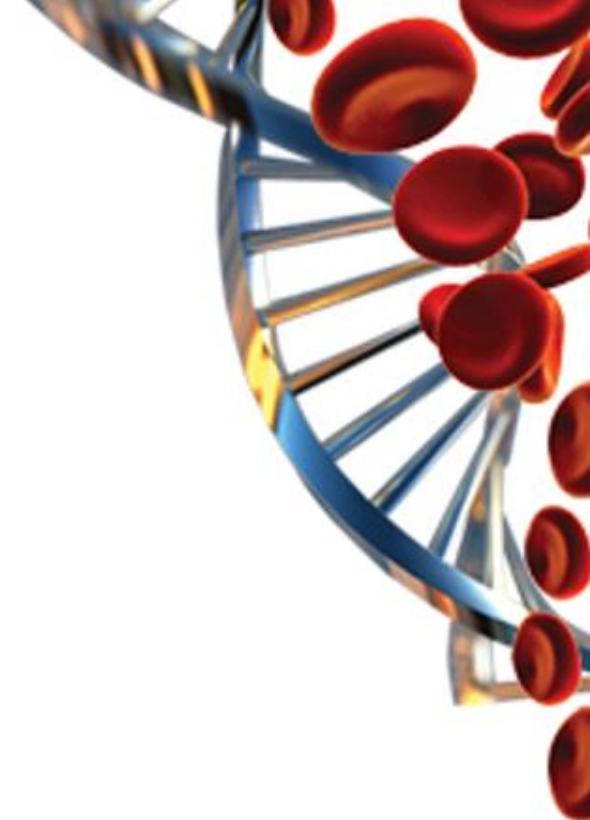


- Patentově chráněný plně automatický přístroj pro snímání obrazu
- Vytváří obraz pole kuliček
- Analyzuje a dekoduje obraz pole kuliček

BioArray Solutions Information Service (BASIS)



- **Systém určený ke zpracování práci s výsledky metody BeadChip**
- **Podporuje všechny aplikace BeadChip**
- **Převádí informace, analyzuje data a generuje reporty**
- **Může být připojen přímo do LIS**



Jak funguje BioArray?

Co je BeadChip?



ÚVN

USTŘEDNÍ VOJENSKÁ NEMOCNICE
PRAHA

GENOTYPIZACE ERYTROCYTÁRNÍCH ANTIGENŮ

1

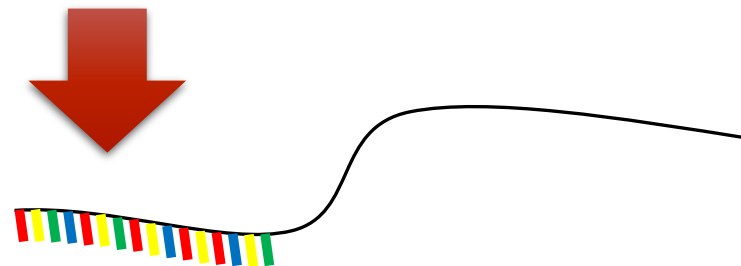
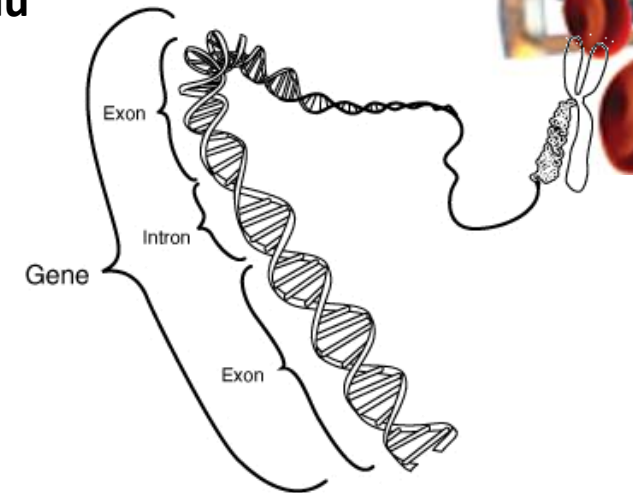
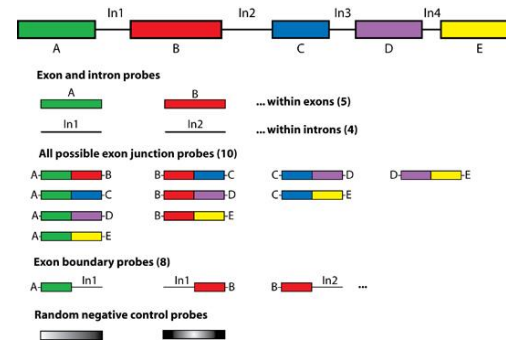


2

Synteticky vyráběné kuličky (3 μ m) jsou označeny barvou
Každá barva koresponduje s danou alelou



Oligonukleotidy genu (např. pro Fy^a) slouží jako sonda
pro danou alelu

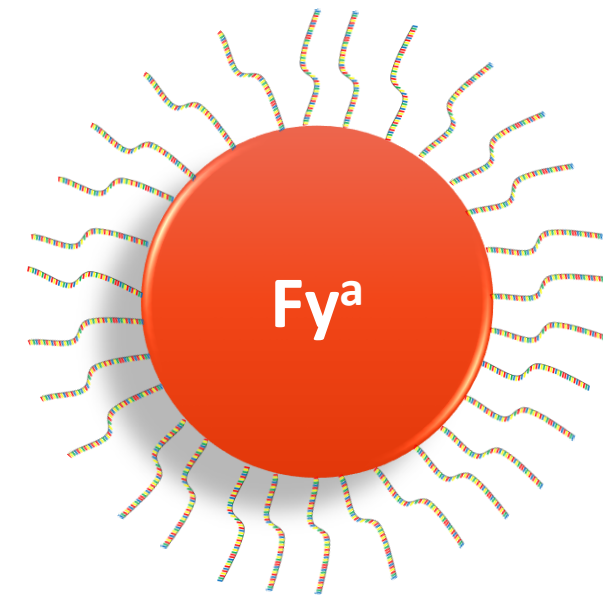
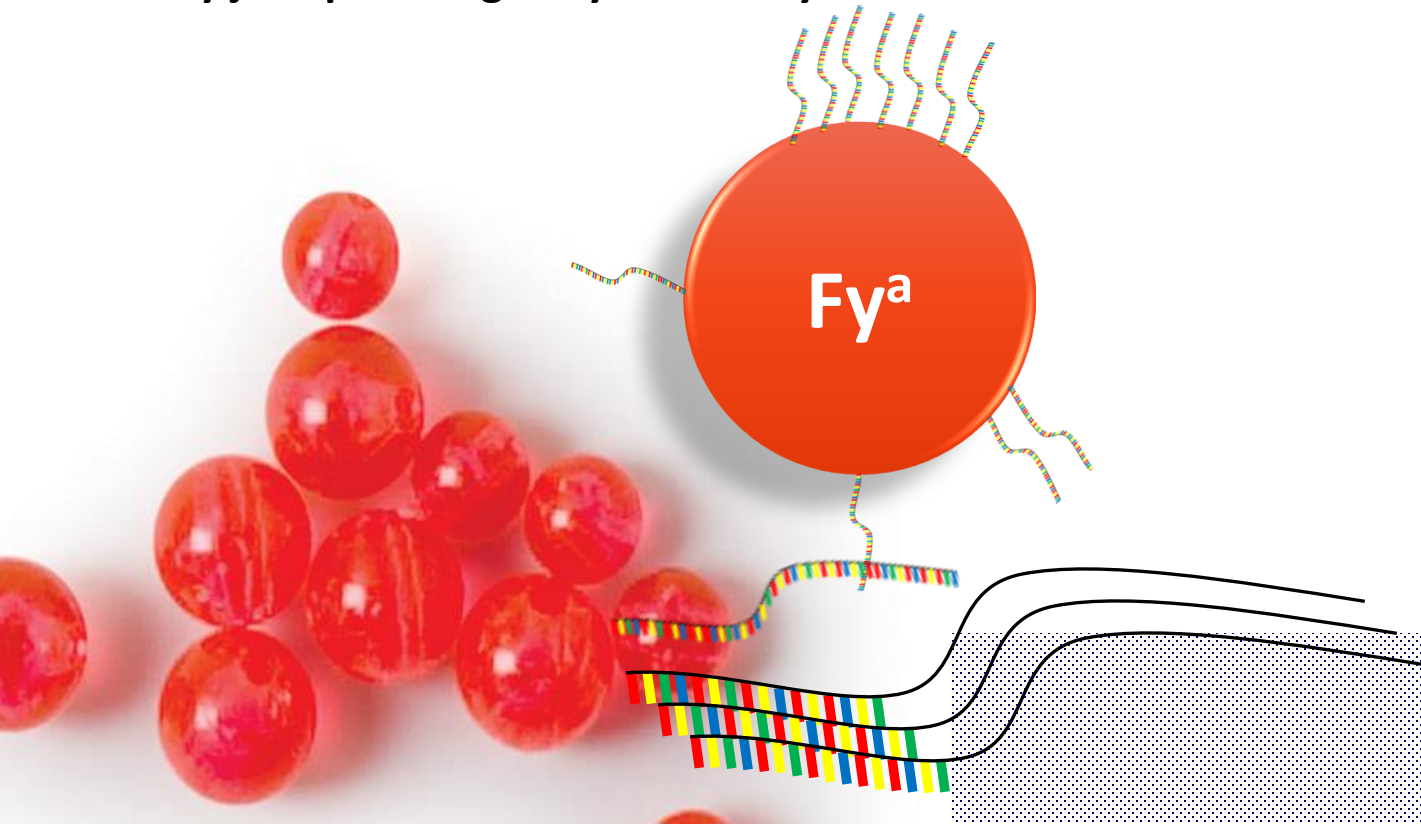


GENOTYPIZACE ERYTROCYTÁRNÍCH ANTIGENŮ

3



Sondy jsou pro antigen Fy^a navázány na červenou kuličku



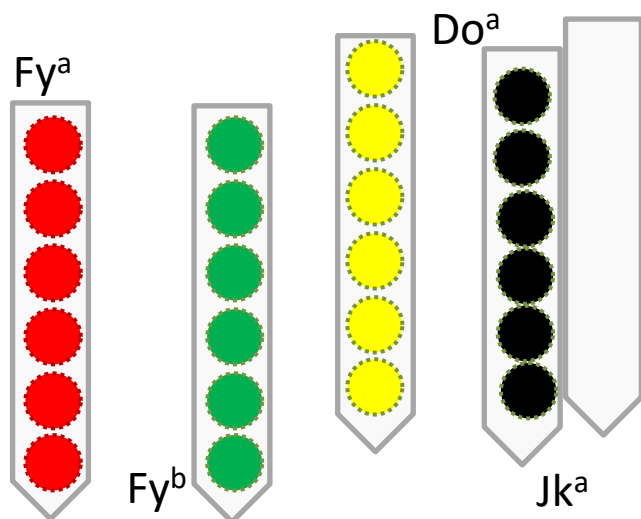
Sondy úplně obalí povrch kuličky
Ta má na svém povrchu přes 1 mil sond

GENOTYPIZACE ERYTROCYTÁRNÍCH ANTIGENŮ

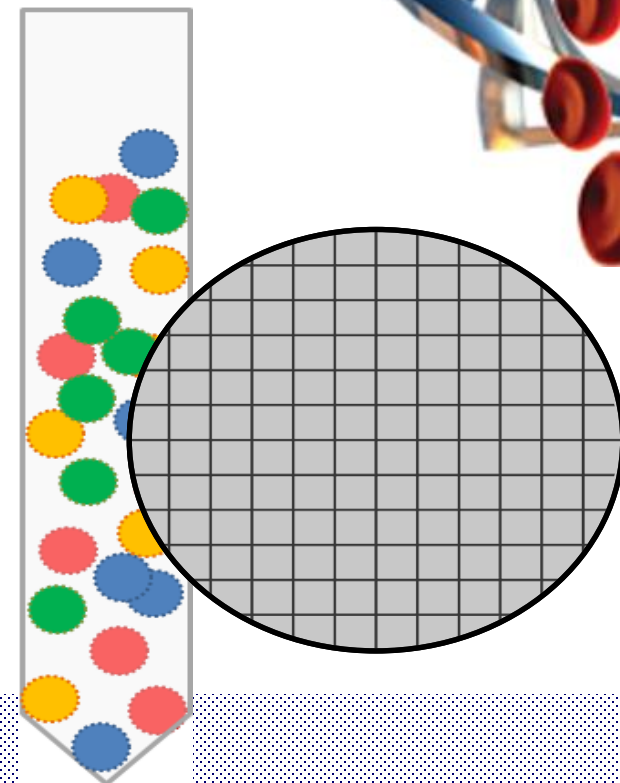
4



Každá alela má jinou barvu kuliček a jsou obaleny unikátními sondami. Barva příslušné kuličky je nasnímána mikroskopem ve viditelném světle a v dané pozici a pak je intenzita emitovaného světla přiřazena příslušné pozici a tedy barvě.



Smíchání kuliček
dohromady a
„nasypání“ na křemíkový
plátek

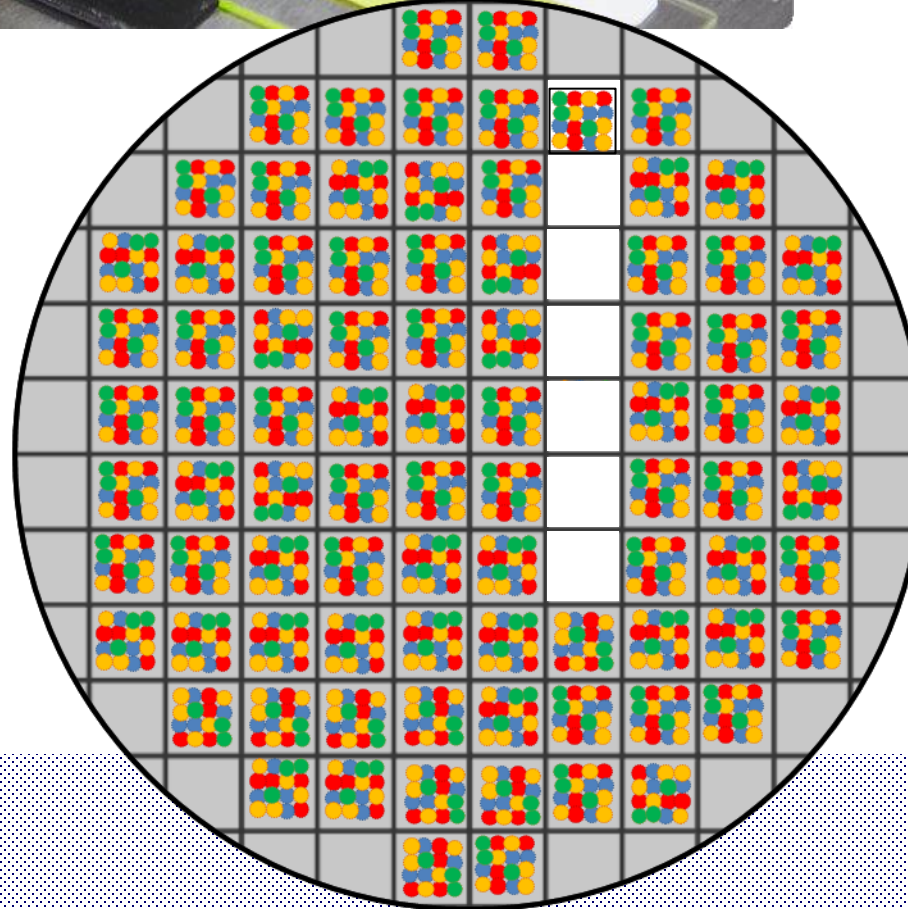
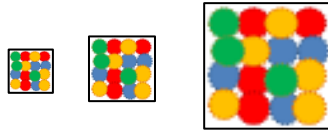
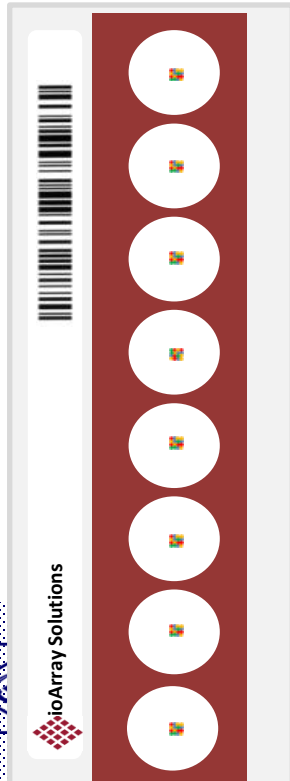


GENOTYPIZACE ERYTROCYTÁRNÍCH ANTIGENŮ

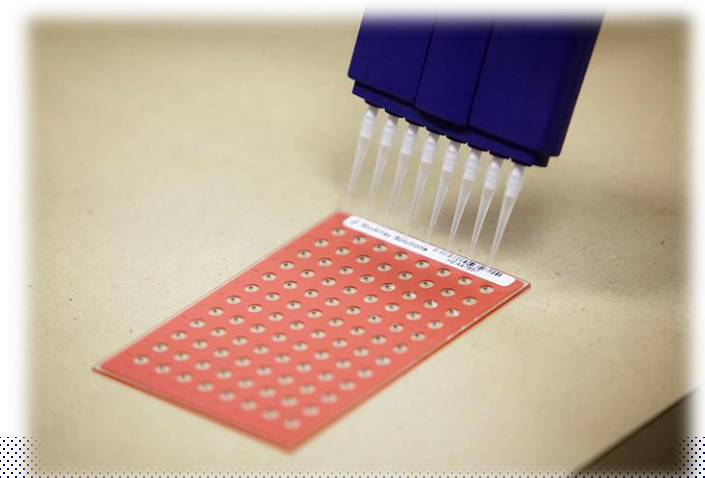
5



Plátek je rozřezán na jednotlivé čipy

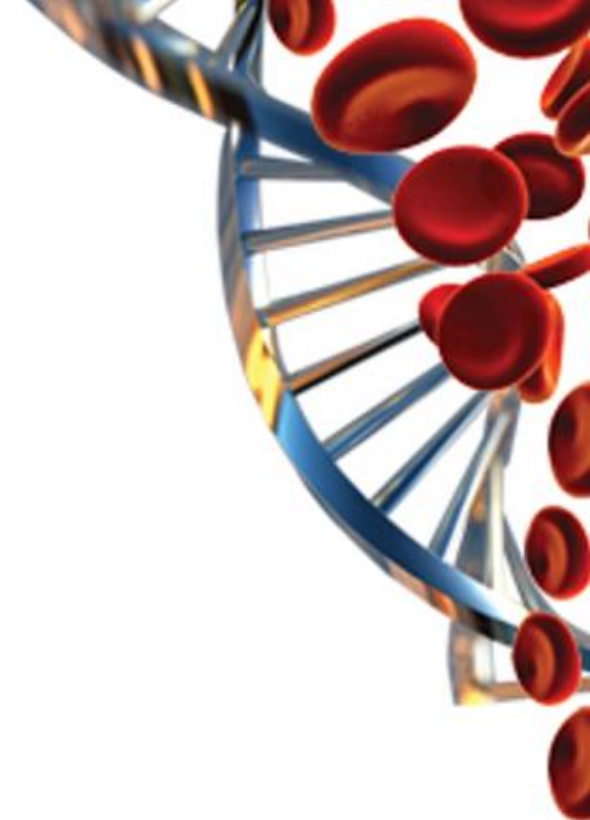


Nosič čipů může být 8 bodový nebo 96 bodový podobný ELISA destičce



ioArray Solutions

HEMOGNICE



Jak funguje BioArray?

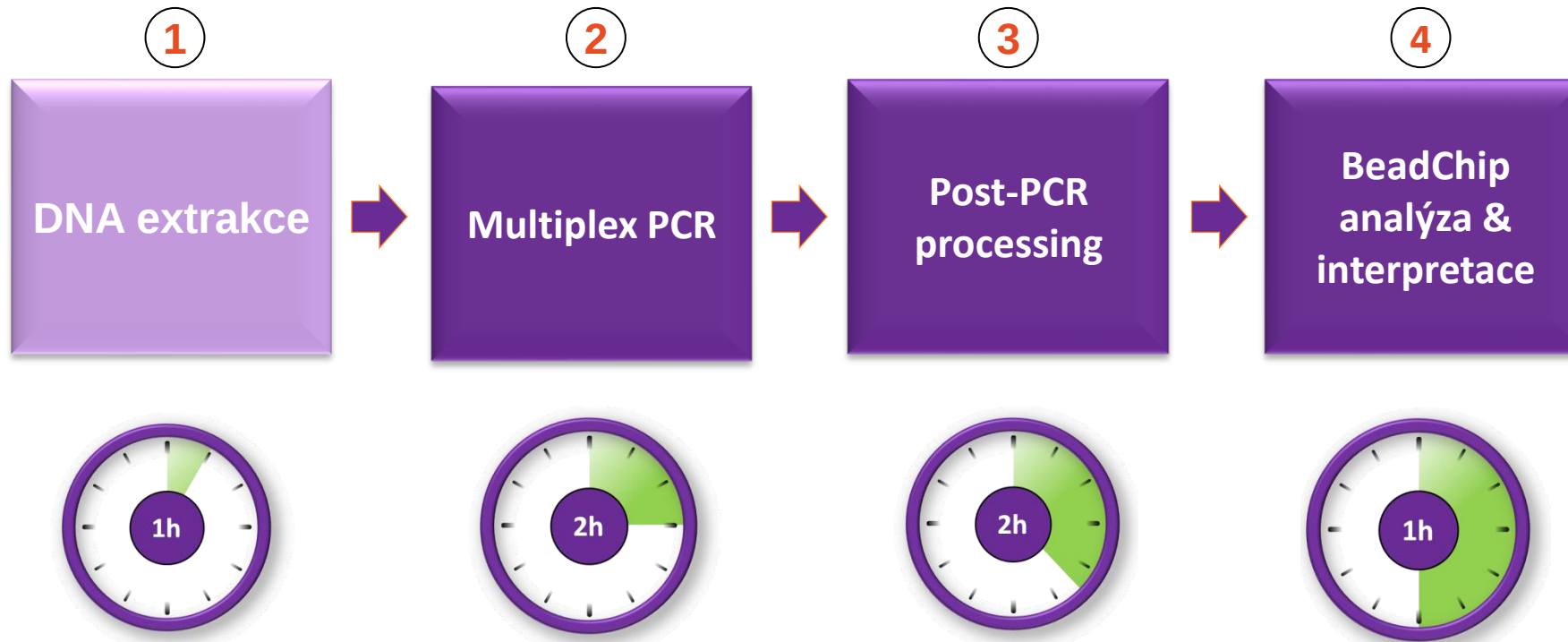
Metodika



ÚVN

ÚSTŘEDNÍ VOJENSKÁ NEMOCNICE
PRAHA

GENOTYPIZACE ERYTROCYTÁRNÍCH ANTIGENŮ



GENOTYPIZACE ERYTROCYTÁRNÍCH ANTIGENŮ

1

DNA extrakce

1h

Vzorky:

- ✓ Pouze plná krev odebraná do EDTA
- ✓ Citrát inhibuje izolaci a pre-post PCR

**Stanovení předchází izolace DNA
z bílých krvinek**

Spektrofotometrické měření koncentrace a čistoty DNA

2



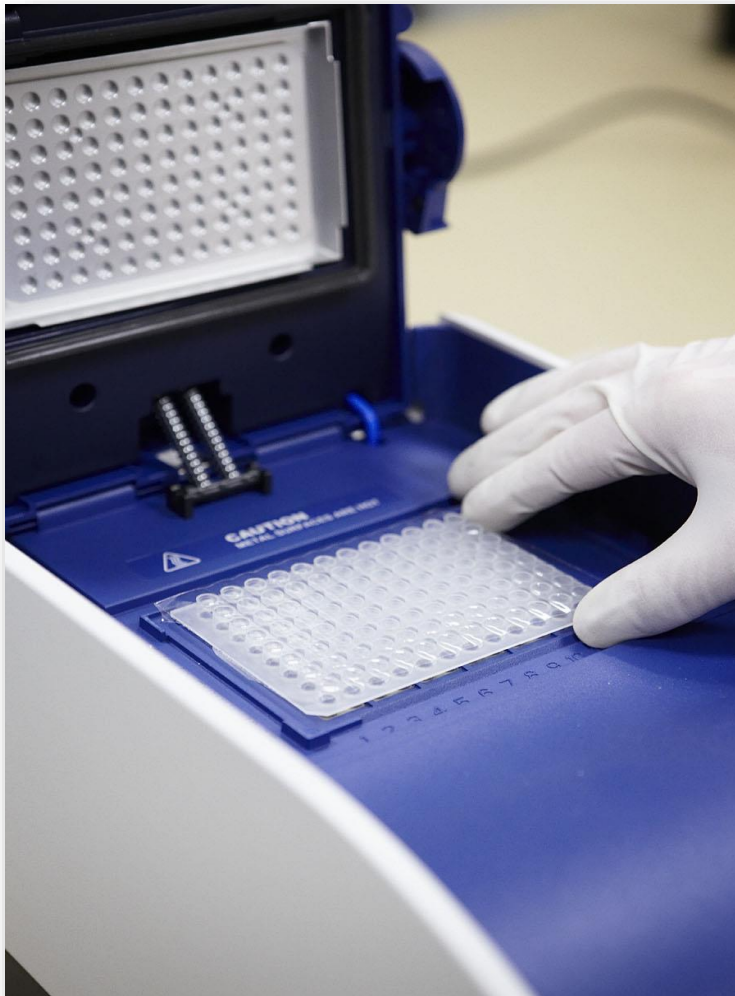
DYNEX

Pro optimální PCR amplifikaci je vyžadována minimální koncentrace extrahované DNA 10 ng/μL



ÚVN
ÚSTŘEDNÍ VOJENSKÁ NEMOCNICE
PRAHA

GENOTYPIZACE ERYTROCYTÁRNÍCH ANTIGENŮ



Multiplex PCR



Několikanásobné cílové sekvence
jsou amplifikovány ve stejném čase

1. Kombinace Taq polymerázy s multiplex PCR mixem
2. Přidání extrahované DNA
3. Multiplex protokol již nastaven v thermocycleru – amplifikace cílových regionů

GENOTYPIZACE ERYTROCYTÁRNÍCH ANTIGENŮ

Post-PCR
processing



Clean -up reagent



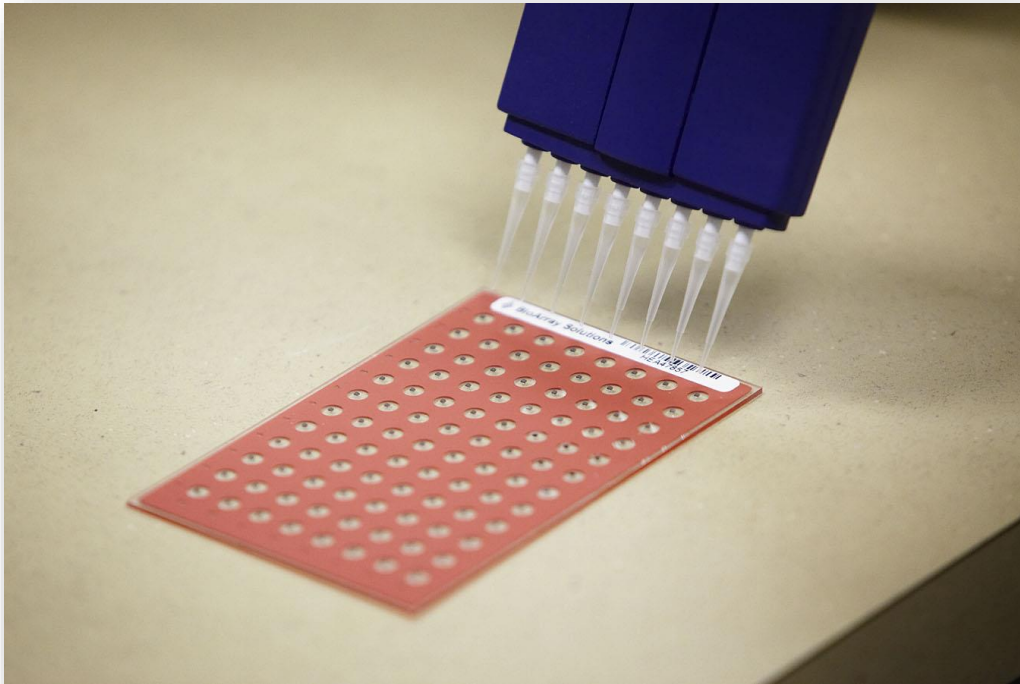
Lambda exonukleáza



ÚVN
ÚSTŘEDNÍ VOJENSKÁ NEMOCNICE
PRAHA

GENOTYPIZACE ERYTROCYTÁRNÍCH ANTIGENŮ

BeadChip
analýza &
interpretace



Elongační reagent

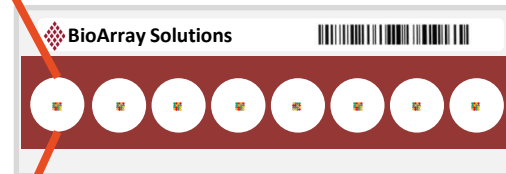
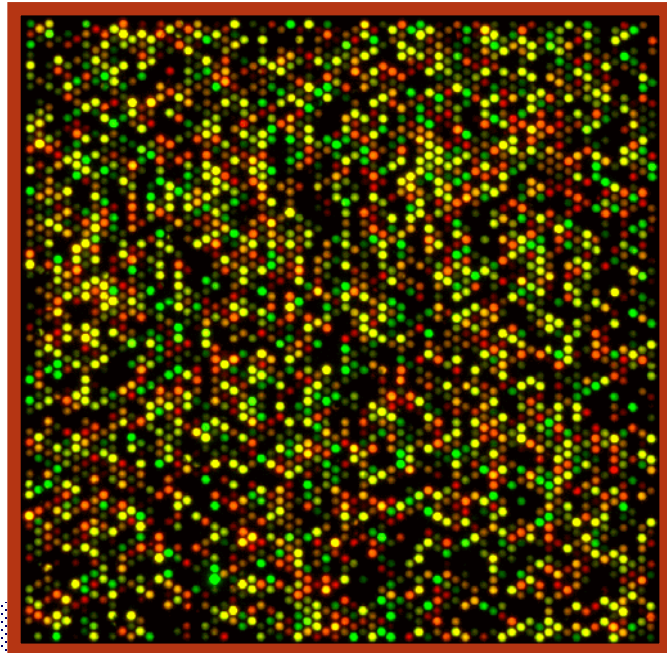


Inkubace v hybridizační troubě 30 min

GENOTYPIZACE ERYTROCYTÁRNÍCH ANTIGENŮ

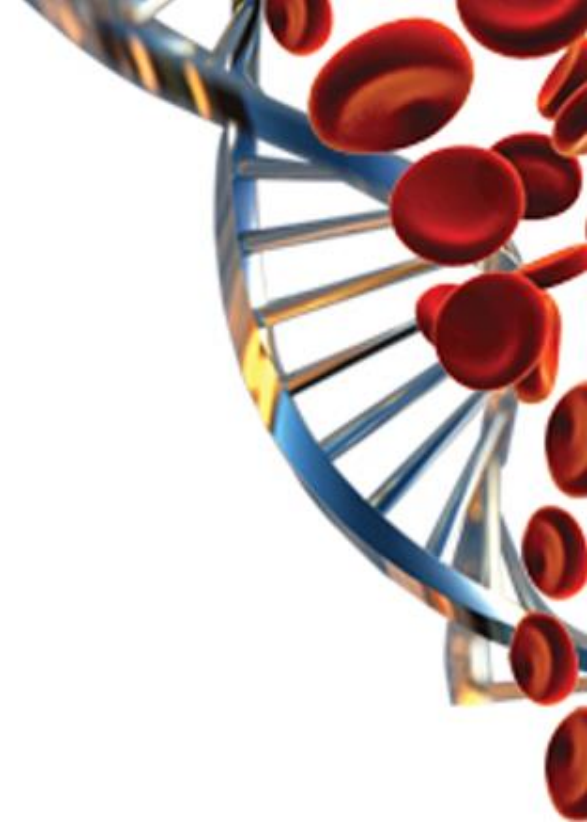


V 1 malém čtverečku > 4000 kuliček



Vyhodnocení“ svítících“ kuliček daného vzorku v mikroskopu, který přečte signál z čipu a porovná ho s „mapou“, načtenou z CD dané šarže kitu





ÚVN
ÚSTŘEDNÍ VOJENSKÁ NEMOCNICE
PRAHA

Jak funguje BioArray?

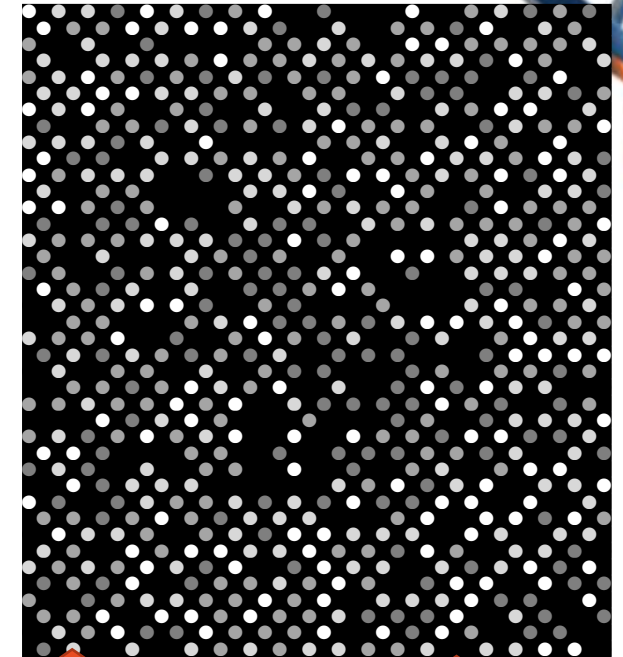
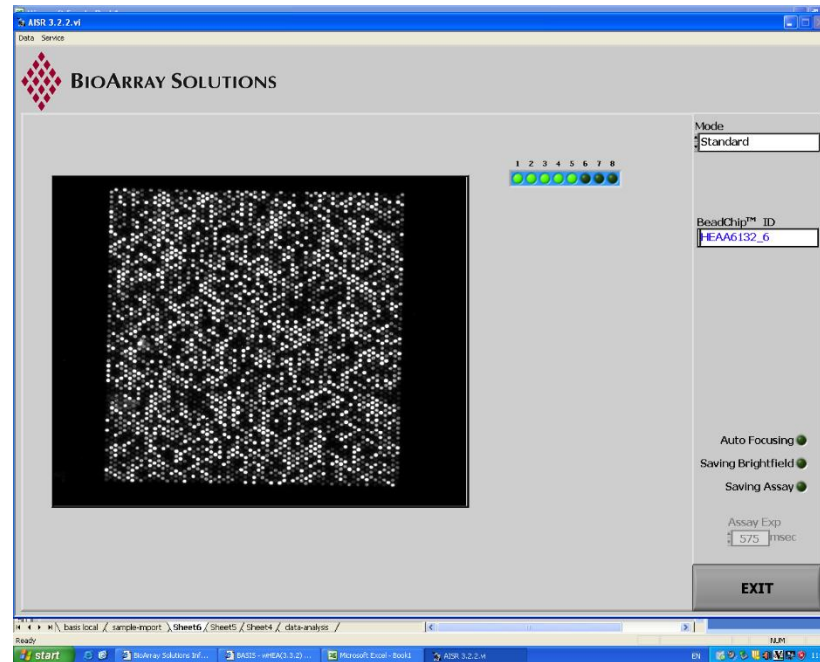
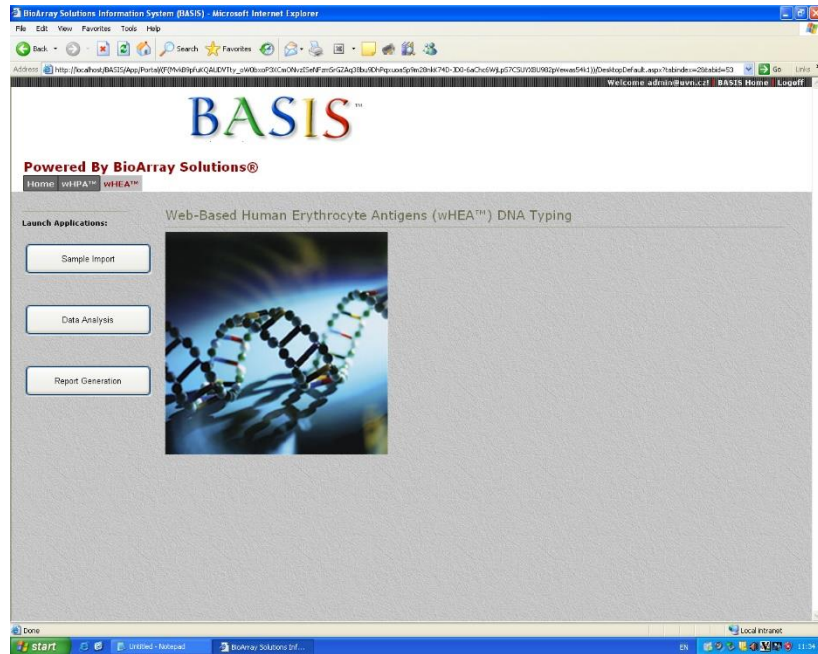
Vyhodnocení



ÚVN

USTŘEDNÍ VOJENSKÁ NEMOCNICE
PRAHA

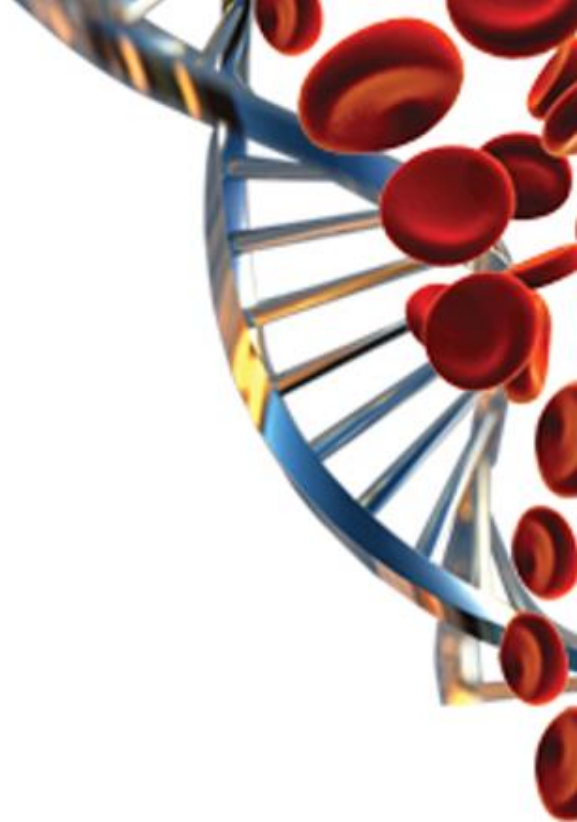
GENOTYPIZACE ERYTROCYTÁRNÍCH ANTIGENŮ



Stanovení pozitivních a negativních reakcí

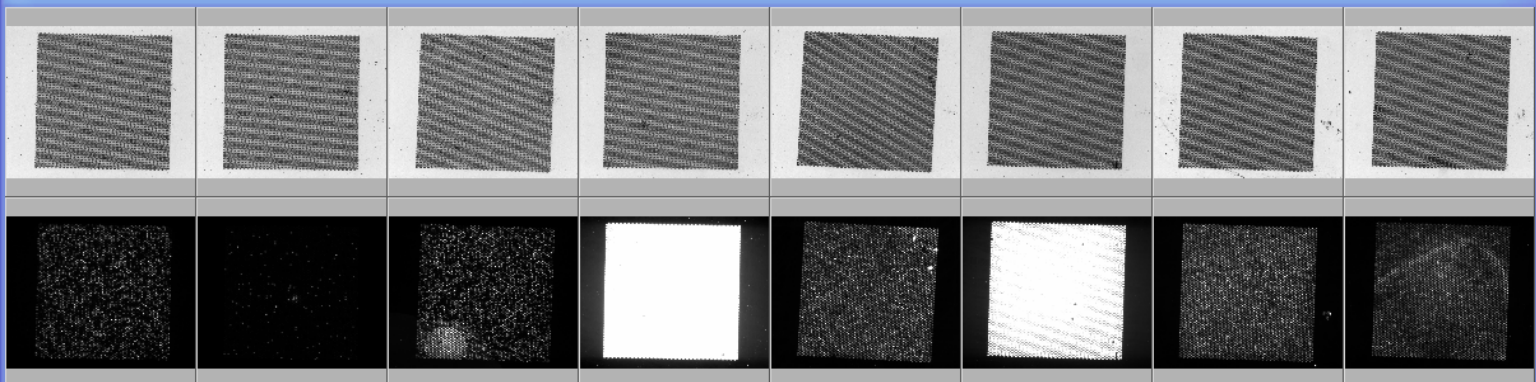


ÚVN
ÚSTŘEDNÍ VOJENSKÁ NEMOCNICE
PRAHA



FINÁLNÍ SCREEN CELÉHO BEADCHIPU

HEAA9669



BeadChip ID

HEAA9669 Summary report :

- # of blurry images = 0
None
- # of merge failures = 0
None
- # of BeadChips that need cleaning = 2
HEAA9669_4
HEAA9669_6
- Lamp Hours = 469
- Exposure Time = 539 msec
- 12/09/15 15:00
End of report

Continue

Auto Focusing ☒

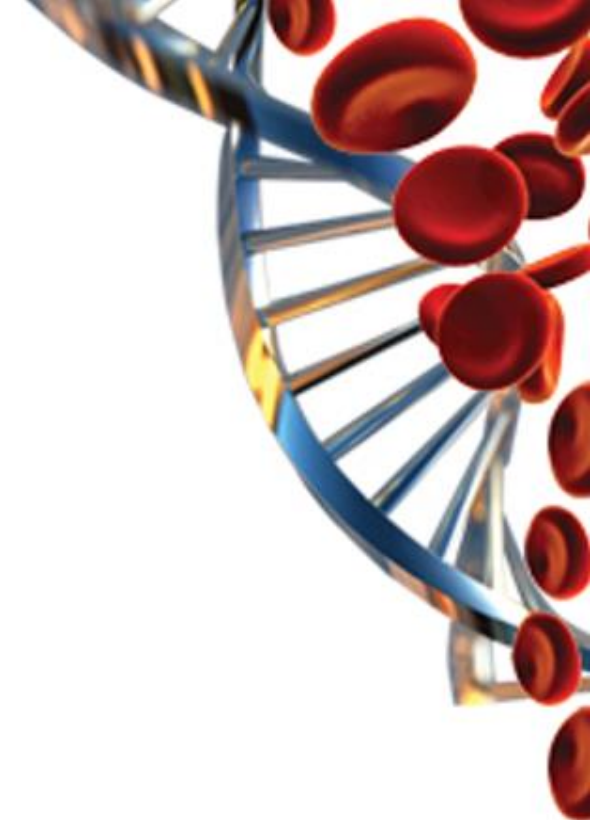
Saving Brightfield ☒

Saving Assay ☒

Assay Exp
539 msec

EXIT

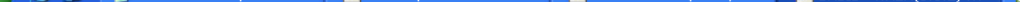
Recycle Bin



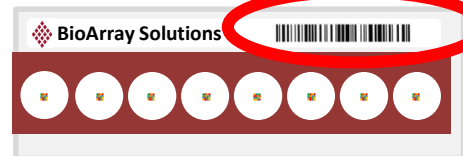
Chip and Sample Information

SIS - wHEA(3.3.2) - SampleAssociation - Microsoft Internet Explorer

Chip-Sample ID Association

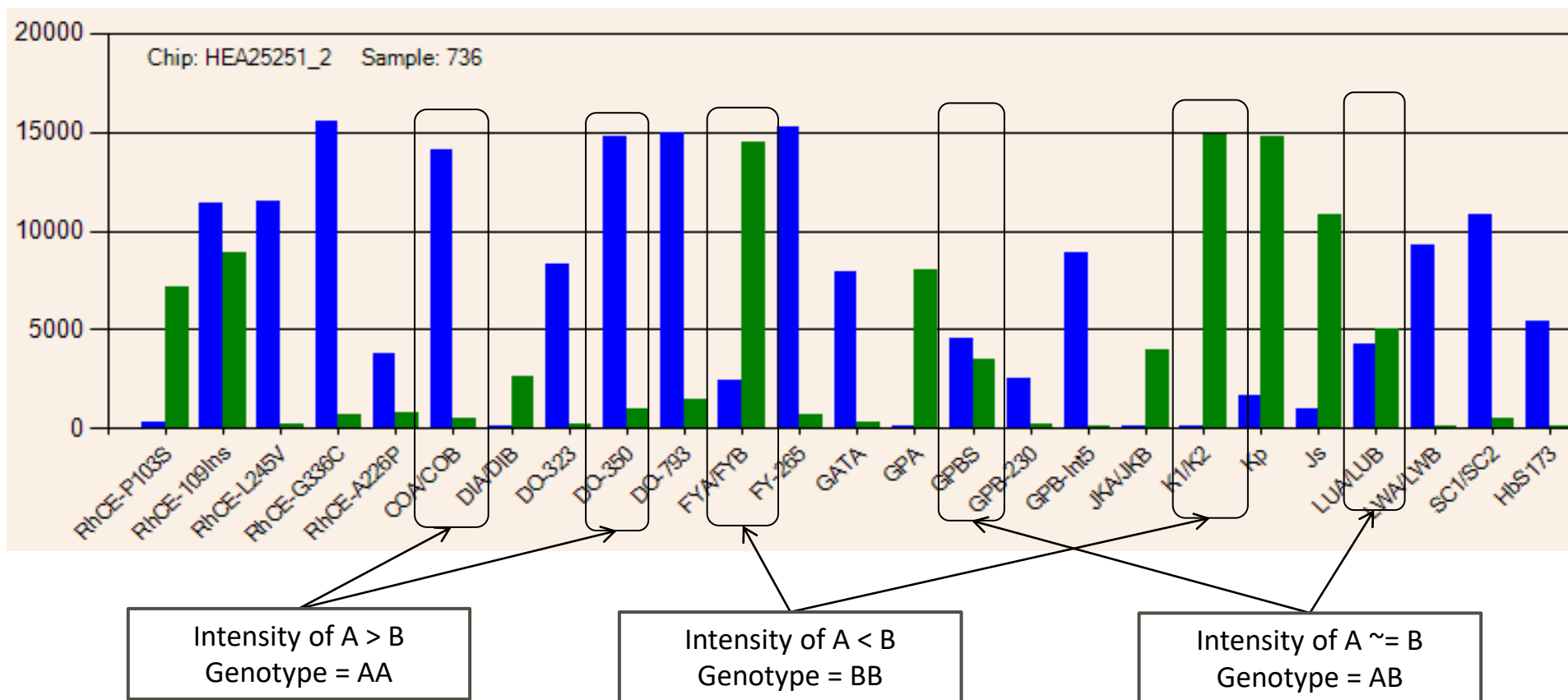


Propojení decoding file s IDbarcode dárců



#	Lab. č.	Odběr	KS	Rodné číslo	Příjmení Jméno
1.	22141174	11.08.2022	O+	[REDACTED]	VEDRAL PAVEL
	CcEe Cw- K- Fy(a+b+) Jk(a-b+) Lu(a-b+)			Le(a-b+) M+N+ S+s+ P1- Kp(a-b+)	
2.	22141179	11.08.2022	O-	[REDACTED]	STEINOVÁ TEREZA
	Dw/v- ccee Cw- K- Fy(a+b-) Jk(a+b+) Lu(a-b+) Le(a-b+) M+N+ S+s+ P1+ Kp(a-b+)				
3.	22114280	09.08.2022	O+	[REDACTED]	Kairuš Pérez Renay
	CcEe Cw- K- Fy(a+b+) Jk(a+b-) M+N+ S+s+ P1+				
4.	22141155	09.08.2022	O+	[REDACTED]	LUDVÍKOVÁ VERONIKA
	ccEe Cw- K- Fy(a+b+) Jk(a+b+) M+N+ S-s+ P1- Kp(a-b+)				
5.	22114373	12.08.2022	O+	[REDACTED]	JANOUŠOVÁ TEREZA
	ccEe Cw- Kk Fy(a+b+) Jk(a+b+) Lu(a-b+) Le(a-b+) M+N+ S+s+ P1+ Kp(a-b+)				
6.	22114192	04.08.2022	O-	[REDACTED]	Škorpilová Kristýna
	Dw/v- ccee Cw- K- Jk(a+b-) M-N+ P1- Kp(a-b+)				
7.	22131088	04.08.2022	O-	[REDACTED]	BRÝDLOVÁ MICHAELA
	Dw/v- ccee Cw- K-				
8.	22141132	04.08.2022	O+	[REDACTED]	HOZNOUROVÁ OLGA
	CcEe Cw- K- Jk(a+b-) M+N+ S-s+ P1+ Kp(a-b+)				

GENOTYPIZACE ERYTROCYTÁRNÍCH ANTIGENŮ



Analýza dat pomocí BASIS: Intenzity jsou určeny a sjednoceny, je vytvořen rozlišovací poměr a je použit algoritmus predikce dané alely.

GENOTYPIZACE ERYTROCYTÁRNÍCH ANTIGENŮ

Phenotype Report



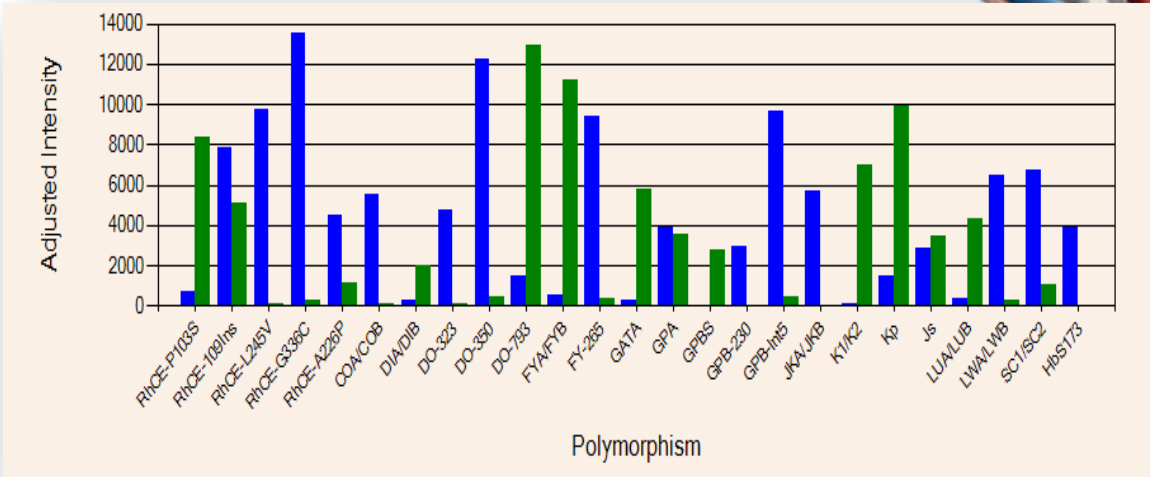
Polymorphism Report

wHEA Phenotype Result Table

Print Date: December 3, 2022

Chip	Sample	Status	Rh			Kell					Kidd			Duffy			MNS			Lutheran			Diego		Colton		Dombrock			LW		Scianna		Hemoglobin S		Detail	Notes		
			c	C	e	K	k	Kpa	Kpb	Jsa	Jsb	Jka	Jkb	Fya	Fyb	M	N	S	s	Lua	Lub	Dia	Dib	Coa	Cob	Doa	Dob	Joa	Hy	LWa	LWb	Sc1	Sc2	HbS	HbS				
HEAL8947_1	22141174	✓	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	0	+	+	+	0	+	0	0					
HEAL8947_2	22141179	✓	+	0	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	0	+	0	0					
HEAL8947_3	22114280	✓	0	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	0	+	0	0					
HEAL8947_4	22141155	✓	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	0	+	0	0					
HEAL8947_5	22114373	✓	+	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0					
HEAL8947_6	22114192	✓	+	0	+	0	0	+	+	0	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0				
HEAL8947_7	22131088	✓	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0				
HEAL8947_8	22141132		0	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0				

ing. Lucie Landová Ph.D.



Jak funguje BioArray?

Naše zkušenosti



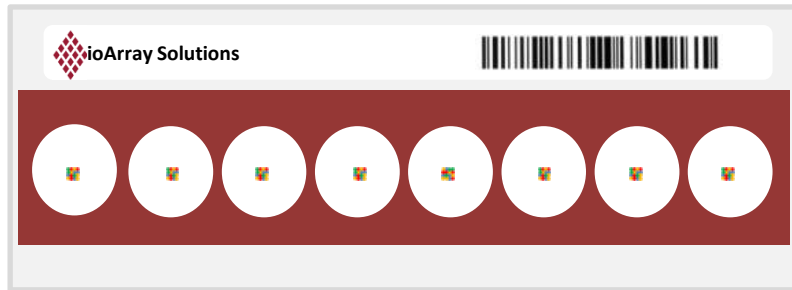
ÚVN

ÚSTŘEDNÍ VOJENSKÁ NEMOCNICE
PRAHA

Bioarray™ v ÚVN Praha

- ✓ V souvislosti s budováním národní banky vzácných erytrocytů bylo nutné rozšířit vyšetřování erytrocytárních antigenů o řadu dalších krevně skupinových systémů.
- ✓ Alternativou k tradiční sérologické metodě, která je zatížena velkou pracností a náklady na vzácná antiséra, jsou moderní molekulárně-biologické metody založené na PCR vyšetření.
- ✓ Metoda vyžaduje sice určitou vstupní investici, vlastní vyšetření a vyhodnocení je pak velmi jednoduché a po zavedení do rutinního provozu dokonce i méně nákladnější, než vyšetření sérologické.

Typování antigenů v ÚVN Praha



1/ Bioarray

c C e E K k Kp(a) Kp(b) Js(a) Js(b) Jk(a) Jk(b) Fy(a) Fy(b) M N S s Lu(a) Lu(b) Di(a) Di(b) Co(a) Co(b) Do(a) Do(b) Jo(a) Hy LW(a) LW(b) Sc1 Sc2 Wr(a) Hb(S)

Neobsahuje: Cw, Le(a) Le (b), P

2/ Serologické metody na NEO IRIS™

c C Cw e E K k Kp(a) Kp(b) Jk(a) Jk(b) Fy(a) Fy(b) M N S s P

Neobsahuje: Le(a) Le(b) Lu(a) Lu(b)

3/ Poloautomatizované metody na Saxo reader

Lu(a) Lu(b) Le(a) Le(b)



**Od 5/2023 Le(a) Le(b) na NEO IRIS™
Lu(a) Lu(b) ????**



ÚVN
ÚSTŘEDNÍ VOJENSKÁ NEMOCNICE
PRAHA

Typování antigenů v ÚVN Praha

landolud - TIS ÚVN Střešovice ver:1.502.b85

Číselníky Jdept2 AMIS Laboratoř Transfuzní služba TransReg Krevní sklad Systém Tisky Nastavení Nápověda Konec

826012/0891 Archiv OHKT_TL

Hlavička Imuno Info Vzorok

R [redacted] **22140895**

O RhD pozit SCR: **NEG** ERY od SCR: Celkem: Cw-ccEe K- k+ Fy(a-b+) Jk(a+b+) Lua- Lub+ Le(a-b+) Js(a-b+) Co(a+b-) M+ N+ P1- S+ s+ Kp(a-b+) LW(a+b-) Di(a-b+) Joa+ Hy+ Sc1+ Sc2- Do(a-b+)

Kr.skupina	Login	Datum a čas	Fenotyp serologie
0 RhD Poz	voslarom	22.06.2022 11:38	Fy: Fya- Fyb+
KS ověř.	voslarom	22.06.2022 12:17	Jk: Jka+Jkb+
SCP NEG	voslarom	22.06.2022 11:46	Ss: S+ s+
D ^{w/v}	voslarom	22.06.2022 13:15	Lua:
Cellano	voslarom	22.06.2022 13:15	Lub: Lub+
Cw:	voslarom	22.06.2022 13:15	Lea: Lea-
Panel	voslarom	22.06.2022 10:47	Leb: Leb+
Titř protilátek anti A,B		M,N,P1 M+ N+P1-	
Titř antiA:	Cut Off:	Fy,Jk,Ss:	
Titř antiB:	Cut Off:	Fenotyp:	

Genotyp ccEe kk Fy(a-b+) Jk(a+b+) Lu(a-b+) Js(a-b+) Co(a+b-) M+N+ S+s+ Kp(a-b+) LW(a+b-) Di(a-b+) Joa+ Hy+ Sc1+ Sc2- Do(a-b+)

landolud 25.07.2022 12:44

NEO IRIS

Saxo

Bioarray



ÚVN
ÚSTŘEDNÍ VOJENSKÁ NEMOCNICE
PRAHA

Typování antigenů v ÚVN Praha

Diskrepance mezi genotypem a fenotypem

landolud - TIS ÚVN Střešovice ver:1.502.b85
Číselníky Jdept2 AMIS Laboratoř Transfúzní služba TrapsReg Krevní sklad Systém Tisky Nastavení Nápvěda Konec

826012/0891 Archiv OHKT_TL

Hlavíčka Imuno Info Vzorok

R [redacted] **22140895**

O RhD pozit **SCR:NEG** ERY od SCR: Celkem: Cw-ccEe K- k+ Fy(a-b+) Jk(a+b+) Lua- Lub+ Le(a-b+) Js(a-b+) Co(a+b-) M+ N+ P1- S+ s+ Kp(a-b+) LW(a-b-) Di(a-b+) Joa+ Hy+ Sc1+ Sc2- Do(a-b+)

Kr.skupina	0 RhD Poz	voslarom	Datum a čas	voslarom	Datum a čas	voslarom	Datum a čas
KS ověř.							
SCP	NEG	☒ voslarom	22.06.2022 08:15	Fy: Fya+ Fyb+	voslarom	22.06.2022 11:38	M: []
D ^{w/v}				Jk: Jka+ Jkb+	voslarom	22.06.2022 12:17	N: []
Cellano				Ss: S+ s+	voslarom	22.06.2022 11:46	P1: []
Cw:				Lua:			Kp: Kpa- Kpb+
Panel				Lub: Lub+	voslarom	22.06.2022 13:15	
				Lea: Lea-	voslarom	22.06.2022 13:15	Leb: Leb+
				M,N,P1	M+ N+P1-		voslarom
				Fy,Jk,Ss:			
				Fenotyp:			

Titř profilátek anti A,B
Titř antiA: [] Cut Off: []
Titř antiB: [] Cut Off: []

Genotyp ccEe kk Fy(a-b+) Jk(a-b+) Lu(a-b+) Js(a-b+) Co(a-b-) M+N+ S+s+ Kp(a-b+) LW(a-b-) Di(a-b-) Joa+ Hy+ Sc1+ Sc2- Do(a-b+)

landolud 25.07.2022 12:44

Opakovaný náběř dárce pro stanovení Fy^a na NEO IRIS

opět neshoda

Referenční laboratoř ÚHKT
Microarray ID CORE XT + serologie

Typování antigenů v ÚVN Praha

Blood group system	Antigens
Rh	C, c, E, e, V, VS
KEL	K, k, Js ^a Js ^b , Kp ^a Kp ^b
Kidd	Jk ^a Jk ^b
Duffy	Fy ^a Fy ^b , Fy ^x , GATA
MNS	M, N, S, s, U, U ^{var}
Dombrock	Do ^a Do ^b , Hy, Jo ^a
Lutheran	Lu ^a Lu ^b
Landsteiner Wiener	Lw ^a Lw ^b
Diego	Di ^a Di ^b
Colton	Co ^a Co ^b
Scianna	Sc1/2



Výhody:

1. Detekce 24 erytrocytárních polymorfismů asociovány 38 antigeny v 1 testu
2. Identifikace weak nebo „silence“ variant
3. Různé varianty kitu 12x8 nebo 1x96

Nevýhody:

Nevýhody:

- Nutnost přesnosti
- Cena
- Izolace DNA
- Neobsahuje P, Le^{ab}, C^w



Děkuji za pozornost

Bioarray by Priscilla Hollingsworth



ÚVN
ÚSTŘEDNÍ VOJENSKÁ NEMOCNICE
PRAHA