

## Genomisk (DNA) typning av erythrocytantigen

### Nordiskt referenslaboratorium

Klinisk Immunologi och transfusionsmedicin (KIT) i Lund är sedan hösten 2001 Nordiskt Referenslaboratorium för Blodgruppsgenomisk Typning (NRLBGT).

### Bakgrund

Idag finns 36 olika blodgruppsystem och över 350 blodgruppsantigener beskrivna. Blodgrupperna styrs av våra gener och inom varje blodgruppsystem finns alternativa varianter, alleler, av respektive gen. Varje individ har sin egen unika uppsättning av blodgruppsmolekyler och har ärvt gener för dessa av båda föräldrarna. Varierande frekvens av blodgruppsvarianter förekommer i olika populationer.

### När används blodgruppsgenomisk typning?

Vanliga indikationer är:

- bestämning av fosterblodgrupp (foster till RhD-negativ, gravid kvinna), screeningmetod
- bestämning av fosterblodgrupp (foster till immuniserad, gravid kvinna), utvidgad metod
- oberoende analys vid oklara serologiska resultat, t.ex. vid ABO- eller RhD-gruppering
- alternativ till fenotypning om patienten har fått blod (s.k. transfusionsblandbild) eller är positiv med direkt antiglobulinteknik (DAT)
- vid typning för högfrekvensantigen där högkvalitativa reagens saknas
- bekräftelse av homo-/heterozygoti hos:
  - givare av testerythrocyter,
  - den blivande pappan för att bedöma risken att fostret kommer att ärva antigenet som mamman är immuniserad mot.

### Analyser

Vid rutinanalys används flera olika principer för att säkerställa resultatet:

- Flera polymorfa positioner inom varje gen undersöks om möjligt.
- Kombinationer av olika metoder som PCR-ASP, PCR-RFLP och/eller Realtids-PCR utförs.
- En metod baserad på Luminex-teknik som detekterar 29 olika genetiska polymorfismer, vilket leder till fenotypsprediktion avseende 37 blodgruppsantigener, utförs. Denna kan även kombineras med metoderna ovan vid behov.

Prover som inte går att lösa inom klinisk rutin kan gå vidare till t.ex. DNA- eller mRNA-sekvensbestämning för att finna orsaken till det avvikande resultatet.

### Frågor

Kontakta i första hand:

KIT i Lund tel. 046-17 32 72

Kontakta i andra hand:

Jourhavande läkare vid KIT i Lund, tel. 046-17 32 20 / 17 32 10.

Om information önskas per e-post, v.g. kontakta:

[Asa.Hellberg@skane.se](mailto:Asa.Hellberg@skane.se) (processledare), [Martin\\_L.Olsson@med.lu.se](mailto:Martin_L.Olsson@med.lu.se) (medicinskt ansvarig)

## Analys Sortiment

### ABO-systemet

Genomisk typning av *ABO* utförs för att kunna fastställa patientens blodgrupp då serologisk analys gett oklara resultat. Ofta rör det sig om förvärvade eller ärftliga varianter med svagare uttryck som benämns A- eller B-undergrupper. Dessa kan vara svåra, tidsödande eller omöjliga att definiera serologiskt men är viktiga att klarlägga när blodgivares blodgrupp ska fastställas, inte minst för att skilja ärftliga från förvärvade blodgrupper. Exempel på förvärvade ABO-fenotyper är svagt A-uttryck vid blodsjukdom och graviditet och förvärvat B-antigen vid exempelvis sepsis då bakterieenzym kan omvandla A-antigen till en B-lik struktur på patientens erythrocyter. Genomisk typning av *ABO* utförs i kombination med en mycket känslig flödescytometrisk analys som med stor säkerhet kan detektera subgrupper och transfusionsblandbilder. Med den senare metoden kan också s.k. (mikro-)chimerism, då genetiskt material från mer än en individ förekommer i cirkulationen, definieras och kvantifieras.

### Rh-systemet (RH)

I Rh-systemet ingår två gener: *RHD* som avgör RhD positiv/negativ fenotyp och *RHCE* som bl.a. ger upphov till antigenen C, E, c och e. Den i vår population vanligaste orsaken till RhD negativ fenotyp är total avsaknad av *RHD*. I populationer av afrikanskt ursprung förekommer en inaktiv, "tyst" *RHD*-gen som kallas *RHD-pseudogenen*, I asiatisk befolkning förekommer bl.a. en mycket svagt uttryckande RhD-fenotyp ( $D_{ei}$ ) i högre frekvens. Utöver detta finns tysta och mycket svagt uttryckande alleler i alla befolkningar men i lägre frekvens.

*RH*-typning innebär flera analyser där olika varianter (normalt, partiellt och svagt uttryck) av *RHD* och *RHCE*-alleler inklusive *RHD-pseudo* kan detekteras.

Det är även möjligt att fastställa om *RHD*-genen finns i enkel eller dubbel uppsättning (zygositetsanalys), något som inte kan avgöras serologiskt. Detta kan vara särskilt värdefullt vid riskbedömning inför planerad graviditet då modern är RhD-immuniserad och den blivande barnafadern RhD positiv.

*RHD*-bestämning på foster till RhD-negativa kvinnor genom analys av fritt foster-DNA i moderns plasma utförs rutinmässigt från graviditetsvecka 10.

*RHD*- och *RHC*-bestämning på foster till immuniserade kvinnor genom analys av fritt foster-DNA i moderns plasma utförs vanligen från graviditetsvecka 16 för att kunna optimera omhändertagandet och optimera behandlingsinsatserna för att undvika hemolytisk sjukdom hos foster och nyfödda (HDFN). Eftersom halten av foster-DNA varierar mellan individer och över tiden så kan i vissa fall ny provtagning behövas senare under graviditeten p.g.a. inkonklusiva resultat. Totala mängden cellfritt DNA i plasma kan också påverkas av andra faktorer, bl.a. av vissa sjukdomar (t.ex. autoimmunitet och preeklampsi) och temperaturförhållanden under provtransporten.

### Duffy-systemet (FY)

*FY*-typning utförs vanligen på provmaterial från en transfunderad patient eller ibland från foster då blodgruppsimmunisering föreligger, men även typning av blodgivare och testerythrocyter utförs. Med typningen kan "tysta" eller svagt uttryckande varianter av *FY*, som kan medföra falsk negativa resultat i serologin, detekteras. Detta minskar risken för att testerythrocyter felaktigt tolkas som homozygota avseende allelerna som kodar för antigenen  $Fy^a$  och  $Fy^b$ . Det minskar också risken att blodgivare med fenotypen  $Fy^x$  misstolkas som negativa för  $Fy^b$ -antigenet. En annan indikation för typning inom detta system (serologiskt eller helst genetiskt) är frågeställningen etnisk neutropeni

## ANVISNING

som visat sig vara kopplad till homozygoti för allelen *FY\*02N.01*.

### **Kell-systemet (KEL)**

Typning av foster tillsammans med blivande mamma och pappa är den vanligaste orsaken till *KEL*-typning. Antikroppar riktade mot *KEL*-glykoproteinet kan orsaka uttalad hämning av erytropoesen i kombination med hemolys vilket ger upphov till en särskilt svår form av fosteranemi med utebliven retikulyocytos och mindre uttalad hemolys än vid HDFN. Anti-K (-*KEL1*) och Rh-antikropparna anti-D och anti-c är de som oftast ger upphov till kliniskt betydelsefull blodgruppsimmunisering under graviditet. Lund tillhandahåller tyvärr ej *KEL*-fosterdiagnostik baserat på fritt foster-DNA i moderns plasma. Sådana prover analyseras exempelvis vid International Blood Group Reference Laboratory i Bristol eller vid Sanquin i Amsterdam. Vi hjälper gärna till att förmedla kontakten till dessa laboratorier. Alternativt kan fostervatten eller korionvillibiopsi typas i Lund men detta är främst aktuellt om sådant prov tas av andra skäl ändå. Analys av fritt foster-DNA i moderns plasma betraktas idag som "state of the art".

### **Kidd (JK) - och MNS- systemet**

Analys av *JK*-genen och genen som styr uttryck av *Ss*-antigenen (*GYPB*) görs i första hand på transfunderade patienter eller blodgivare där fenotypen inte kan bestämmas. I båda fallen kan även de minst ovanliga av de sällsynta "tysta" varianterna inom respektive system fastställas, d.v.s. de som i homozygot form leder fram till fenotyperna *Jk(a-b-)* resp. *S-s-U-*.

### **Dombrock (DO)- och Colton (CO)-systemet**

Reagens för serologisk typning av Dombrock- och Colton-blodgruppsantigenen är en bristvara. Därför kan genotypning vara ett alternativ vid analys av såväl patientprov som blodgivare och testerytrocyter.

### **Analyspaket**

Transfusionsgenotyp: *RHCE, FY, JK, MNS, KEL, DI, DI, CO, YT och LU*

Denna analys av multipla blodgruppsystem görs på patienter som redan är transfunderade eller DAT-positiva (då fenotypning ej är tillförlitlig) eller som förväntas bli kroniskt eller massivt transfusionskrävande. Syftet är främst att bättre kunna matcha blod för transfusion enligt patientens egen fenotyp. Analysen utförs också på patienter med antikroppar för att lättare kunna utesluta/identifiera tänkbara antikroppsspecificiteter. Om inremitterande efterfrågar det kan ett förslag på transfusionsrekommendation lämnas baserat på resultatet av analysen.

Testerytrocyter: *RHD, RHCE, FY, JK, MNS, KEL, DI, DO, CO, YT och LU*

Samma analys som ovan i kombination med analys av *RHD*-genen utförs. Om givaren predikteras vara RhD-positiv vid *RHD*-genotypning ingår också *RHD*-zygositetsbestämning.

Högfrekvensantigen inklusive trombocytantigenet HPA-1a

Denna undersökning predikterar sex högfrekventa antigen (HFA) med relevans inom transfusionsmedicin: *Kp<sup>b</sup>*, *Yt<sup>a</sup>*, *Vel*, *Co<sup>a</sup>*, *Sc1* samt HPA-1a. Varje antigen är kliniskt relevant vid transfusion och avsaknad av antigenen förekommer i varierande grad men är ovanligt eller sällsynt. Framför allt typas blodgivare men även patienter vid misstanke om antikroppar mot respektive antigen.

Utgiven: Juni 2018

Ansvarig: Klinisk immunologi och transfusionsmedicin

### Övrigt

Dessutom kan, efter särskild överenskommelse, bestämmningar inom andra blodgruppsystem ske. Detta gäller t.ex. prediktion av antigenen H/sekretorstatus (*FUT1/FUT2*), P1 och P<sup>k</sup> (*A4GALT*), P (*GLOB/B3GALNT1*), Forssman (*FORS/GBGT1*), Vel (*SMIM1*), Xg<sup>a</sup> och Cromer (*DAF*) etc.

### Provtagning till genomisk typning

#### DNA-typning - blodgruppsantigen

**Remiss:** *Remiss för DNA-typning - blodgruppsantigen*

Provtagningsanvisning finns på remissens baksida.

**Provmaterial:** Rutinmässigt tas venprov i rör med EDTA- eller ACD-tillsats enligt Socialstyrelsens föreskrifter. Ur detta kan erythrocyter och blodgruppsantikroppar utvinnas till serologisk analys, men även DNA till genanalys.

För analys av DNA kan även annat provmaterial användas under förutsättning att det innehåller kärnförande celler eller i förväg preparerat DNA. För att fastställa fosterblodgrupp är plasma från blodprov taget på den gravida kvinnan det lämpligaste provmaterialet. I vissa fall kan provtagning även bli aktuellt från navelsträng, moderkaka eller fostervatten. Fostervatten ska tas i steril rör/flaska utan tillsats. En provvolym om ca 5-10 ml är önskvärt.

För att undvika behovet av amniocentes eller chorionvilli-biopsi används på senare år känsliga metoder för detektion av fritt foster-DNA i den gravida kvinnans plasma för RhD och Rhc.

Öppna inte provet efter provtagning. Detta är extra viktigt om analys av foster-DNA i moderns plasma ska utföras! Provet bör nå KIT inom 5 dygn efter provtagning. Tidsintervallet är extra viktigt om analys av foster-DNA i moderns (immuniserad) plasma ska utföras.

#### Fetal RHD-screen

**Remiss:** *Remiss för Fetal RHD-screen*

Provtagningsanvisning finns på remissens baksida.

**Provmaterial:** Rutinmässigt tas venprov i rör med EDTA enligt Socialstyrelsens föreskrifter. Ur plasman kan foster-DNA utvinnas för genanalys.

Öppna inte provet efter provtagning. Provet bör nå KIT inom 5 dygn efter provtagning.

#### Transport

Skicka provet enligt de rutiner som finns.

Adressera kuvertet: *Labmedicin  
Klinisk immunologi och transfusionsmedicin  
Blodgruppsgenomisk typning  
222 42 Lund*