MEDICINA
TRANSFUSIONAL
CAPITULO CHILENO

BLOOD TYPING SOLUTIONS
Compatible with you
GRIFOLS

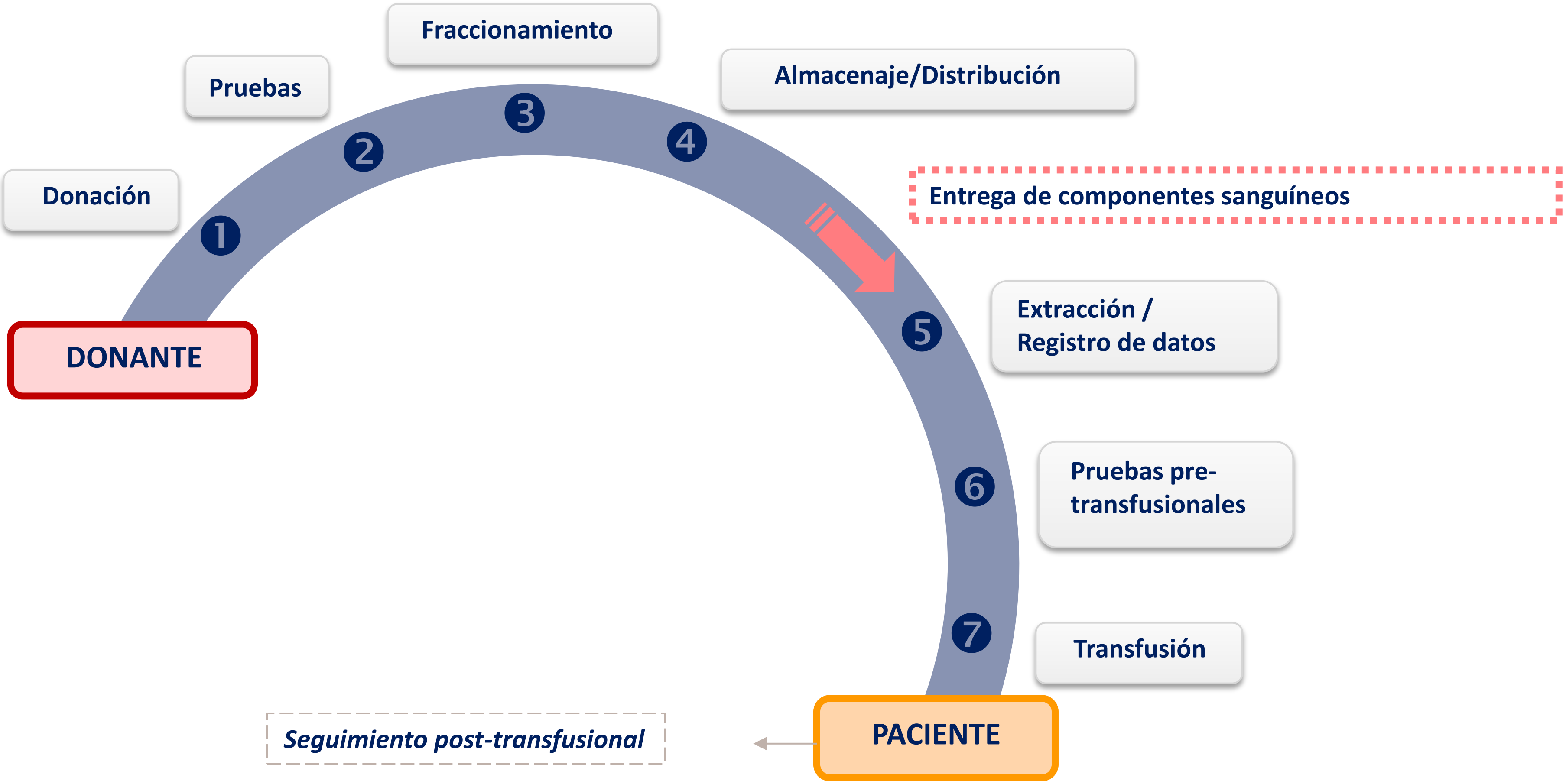
Bloodchip ID Aplicaciones de la Biología Molecular en Banco de Sangre

CHILE, JULIO 2014

Sumario

- ✓ Medicina transfusional – Pruebas pre transfusionales
- ✓ Limitaciones de la Serología
- ✓ Genotipado Molecular – métodos
- ✓ Beneficios del Genotipado Molecular
- ✓ Bloodchip – solución para el Genotipado Molecular
- ✓ BIDS XT – software de gestión del genotipado Molecular

Medicina Transfusional



Donación

Pruebas

Fraccionamiento

Almacenaje/Distribución

Entrega de componentes sanguíneos

Extracción / Registro de datos

Pruebas pre-transfusionales

Transfusión

DONANTE

PACIENTE

Seguimiento post-transfusional

Pruebas pre-transfusionales

- En la actualidad, es obligatorio y necesario llevar a cabo pruebas pre-transfusionales de compatibilidad antes de empezar cualquier transfusión sanguínea.

- **Objetivo:** Seleccionar la sangre o componentes sanguíneos más seguros para el receptor con el fin de evitarle cualquier daño.

Pruebas pretransfusionales: tipos

- Tipaje ABO (Grupo hemático y sérico)
- Tipaje Rh
- Investigación de anticuerpos
  - ✓ Escrutinio de anticuerpos
  - ✓ Identificación de anticuerpos
  - ✓ Titulación de anticuerpos
- Prueba cruzada
- Fenotipo extendido
- Coombs directo
- Autocontrol

- Técnicas de biología molecular: Genotipado

Limitaciones de serología I

Limitaciones técnicas

- Los reactivos de serología, si están disponibles, son caros y poco fiables.
- Muchos antisueros utilizados no tienen aprobación CE / FDA
- El análisis de antígenos menos frecuentes mediante métodos manuales, laborioso y excesivo tiempo.
- Los antisueros están individualizados.
- Interpretación subjetiva en expresiones débiles
- Los antisueros no siempre reaccionan con antígenos de baja inmunogenicidad o de baja expresión génica

Limitaciones de serología II

Limitaciones clínicas

- Pacientes multitransfundidos (Talasemias, enfermedad de células falciformes; SCD, anemia hemotítica autoinmune, anemias refractarias, drepanocitosis, oncohematológicas)
- Pacientes con prueba de la antiglobulina directa positiva.
- Pacientes recientemente transfundidos
- Pacientes con autoanticuerpos
- Determinar la zigosidad RHD en individuos D-positivos
- Limitación registros donantes antígeno-negativo o perfiles “raros”
- Estudio prenatal: predecir profilaxis de RhIg y el riesgo HDFN , TFNA

Cuando la serología no es suficiente

↓

Sólo existe un vía disponible

↓

Genotipado molecular

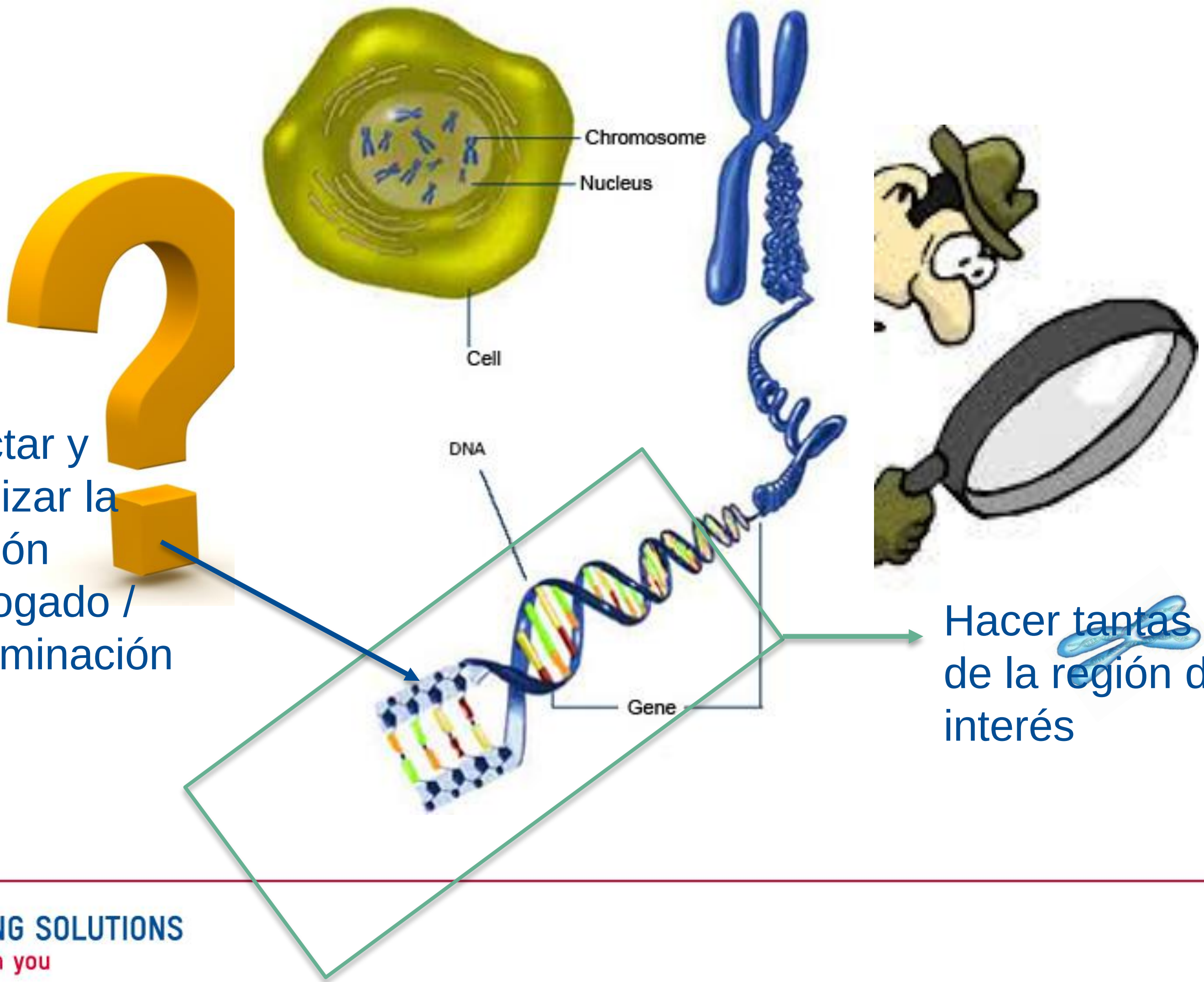
01.

Genotipado de Grupos Sanguíneos

Definición
Utilidad Clínica
Métodos

Genotipado Molecular

- Composición genética de un individuo


Chromosome
Nucleus
Cell
DNA
Gene

Detectar y visualizar la posición interrogado / Discriminación

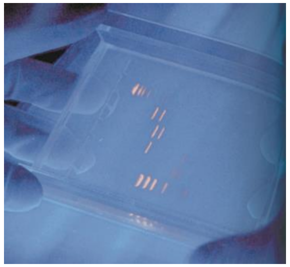
Hacer tantas copias de la región de interés

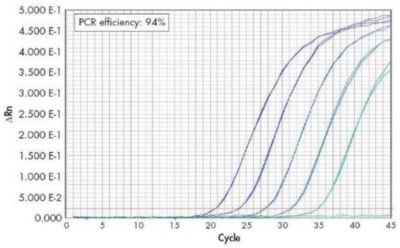
¿Cómo nos fijamos en los genes?

Métodos

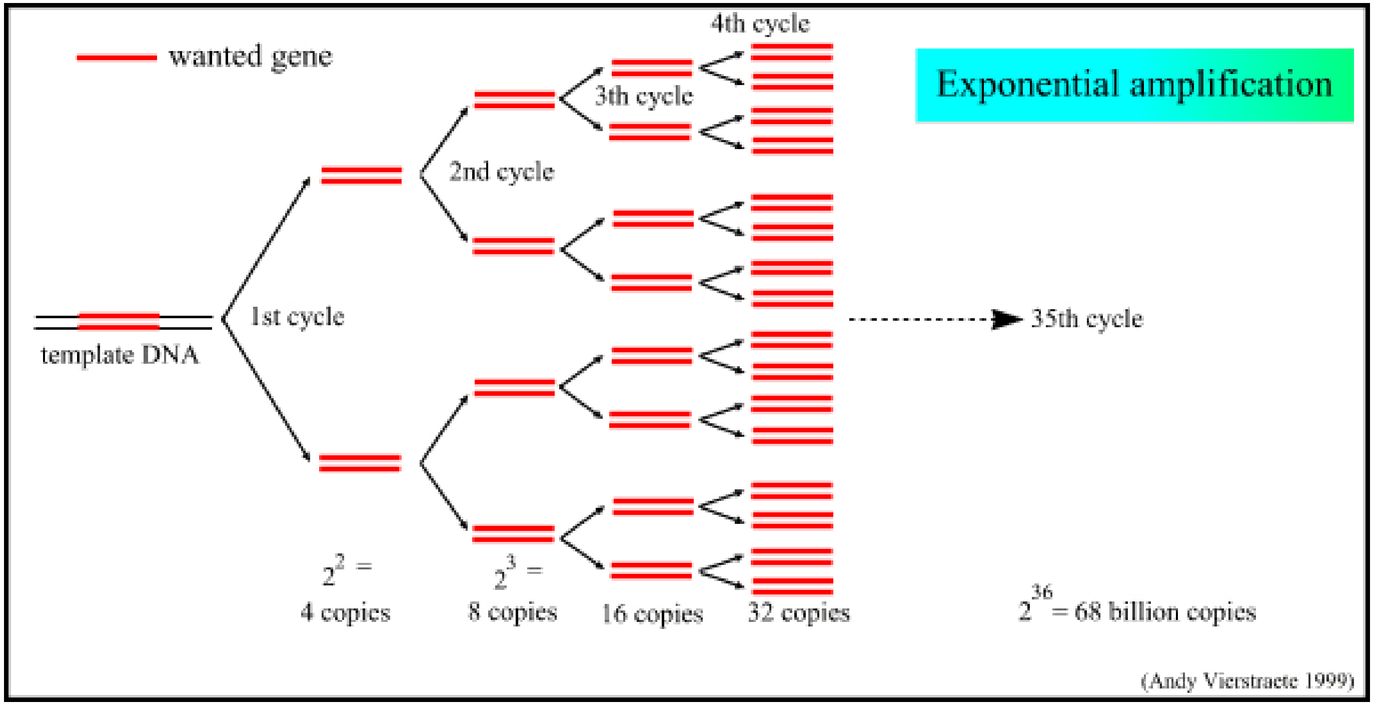
PCR convencional

Extracción DNA/RNA **Amplificación** **Detección**





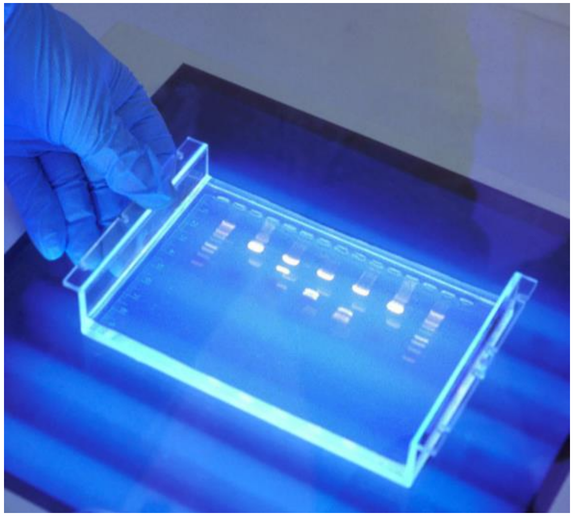
Polymperase Chain Reaction (AMPLIFICACIÓN)


wanted gene
Exponential amplification
4th cycle
3th cycle
2nd cycle
1st cycle
template DNA
35th cycle
2^2 =
4 copies
2^3 =
8 copies
16 copies
32 copies
2^{36} = 68 billion copies

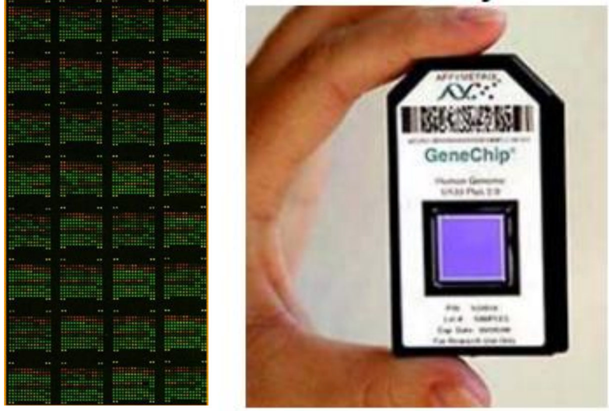
(Andy Vierstraete 1999)

Métodos de detección

- Eletroforesis en gel de agarose
- Fluorescencia (PCR – tiempo real)



Métodos de detección


AFFYMETRIX
GeneChip

microarrays

Luminex 100

Array en suspensión

Genotipado de Grupos Sanguíneos

Paciente

DETERMINA EL VERDADERO GRUPO SANGUÍNEO

- ✓DAT+ : warm autoinmmune hemolytic anemias
- ✓Multi-transfused: SCD patients, anemias, aplastic anemias, oncology patients etc.
- ✓Recently transfused patients
- ✓Pregnant women
- ✓Unresolved RhD/RhCE

Donante

SUMINISTRA LA UNIDAD DE SANGRE CORRECTA

- ✓Build a large donor base
- ✓Find negatives for high-frequency Ag
- ✓Find rare Ag combinations

Beneficio para los pacientes?

Evita las complicaciones aloinmunización

Minimiza las reacciones adversas

Evita aloinmunización

↓$

Disminuye el tiempo de hospitalización

Aumenta el tiempo entre la transfusión

¿Qué sucede en el sitio donante?

Varios antígenos simultáneamente

Reduce el tiempo y el costo para suministrar unidades

Reduce el tiempo operativo

↓$

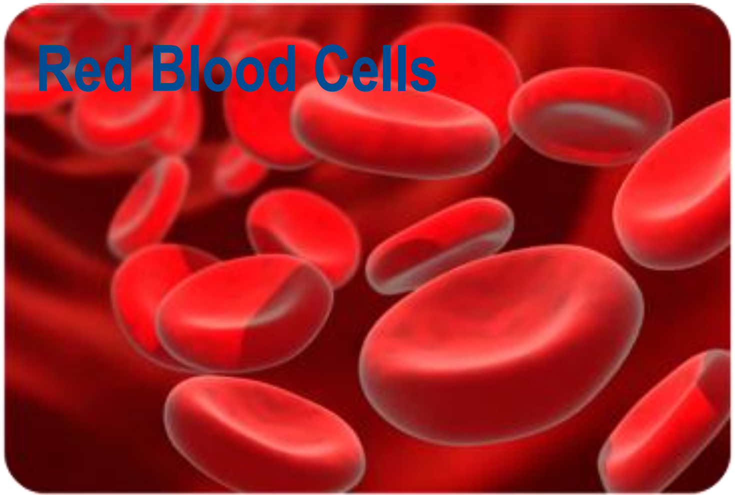
Base de datos de donantes

No requiere elevado conocimiento técnico

Antisueros pueden ser caros

BLOOD chip ID

- IVD tests
- Main allelic variants of:



Red Blood Cells

Human Platelet Antigens

Bloodchip® es un test de biología molecular a gran escala diseñado para ser incorporadas en laboratorios de Transfusión Sanguínea y Centros de Donación de Sangre.

La genotipificación del grupo sanguíneo permite mejorar la seguridad en la transfusión sanguínea a través de estudios de compatibilidad más extensos entre los perfiles antigénicos de donante y de los hematíes de receptor.

La identificación genética es el método de rutina más ampliamente utilizado para el estudio de las variantes sanguíneas clínicamente más relevantes relacionadas con la Medicina Transfusional.

Genotipificación de pacientes
Genotipificación de donantes
Genotipificación de gestantes

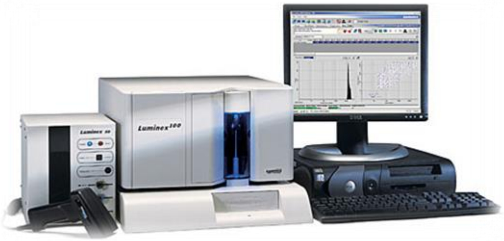
EQUIPOS ESENCIALES REQUERIDOS

TERMOCICLADOR PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL DNA

- **Gold plated 96-well GeneAmp® PCR system 9700 (AB)**
- **Aluminium plated 96-well GeneAmp® PCR system 9700 (AB)**
- **Veriti® Dx 96-Well(AB)**
- **Veriti® 96-Well(AB)**

CITOMETRO DE FLUJO

- **Luminex® 100/200^{TM} System**
- **Softwares: Luminex IS100 2.3 or xPONENT 3.1**



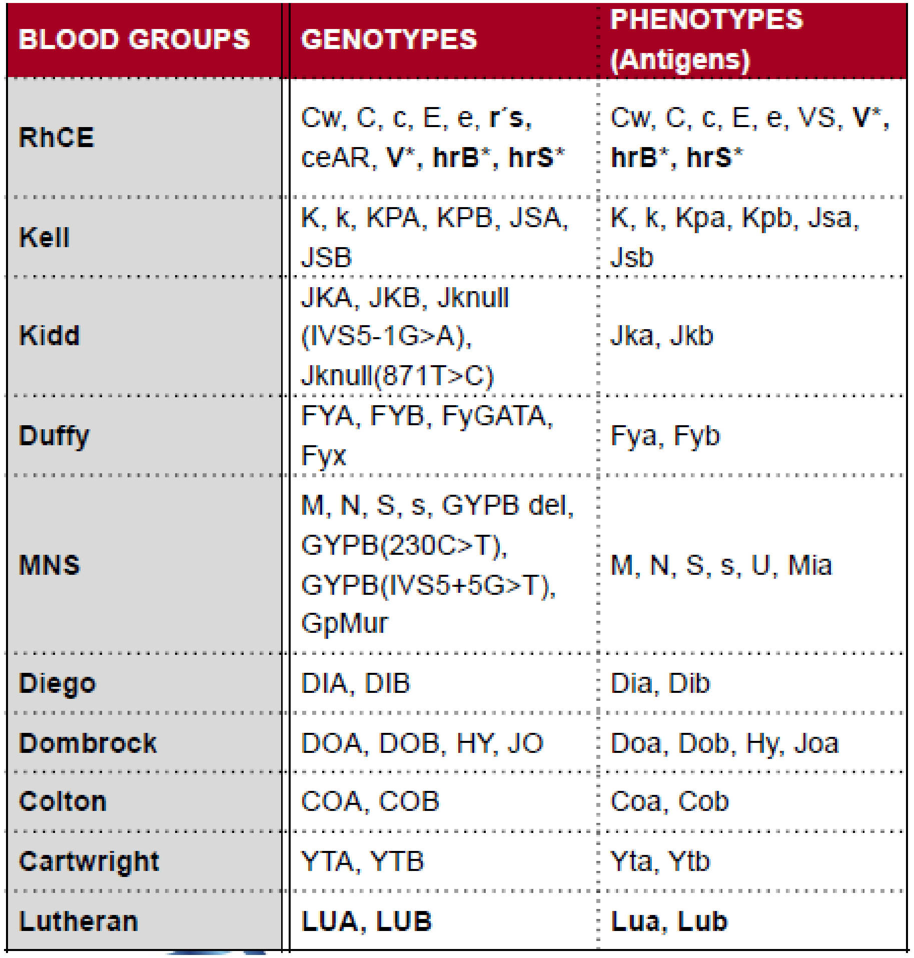
COMPONENTES Y ESPECIFICACIONES DEL KIT

IDCORE XT

31 *POLIMORFISMOS* (33 antígenos) analizados:

CONTENIDO 1 kit: 48 determinaciones/kit

VELOCIDAD DE PROCESADO: hasta 96 muestras/análisis, 30 minutos manipulación manual, 4,5 horas de tiempo de procesado



BLOOD GROUPS	GENOTYPES	PHENOTYPES (Antigens)
RhCE	Cw, C, c, E, e, **r´s**, ceAR, **V***, **hrB***, **hrS***	Cw, C, c, E, e, VS, **V***, **hrB***, **hrS***
Kell	K, k, KPA, KPB, JSA, JSB	K, k, Kpa, Kpb, Jsa, Jsb
Kidd	JKA, JKB, Jknull (IVS5-1G>A), Jknull(871T>C)	Jka, Jkb
Duffy	FYA, FYB, FyGATA, Fyx	Fya, Fyb
MNS	M, N, S, s, GYPB del, GYPB(230C>T), GYPB(IVS5+5G>T), GpMur	M, N, S, s, U, Mia
Diego	DIA, DIB	Dia, Dib
Dombrock	DOA, DOB, HY, JO	Doa, Dob, Hy, Joa
Colton	COA, COB	Coa, Cob
Cartwright	YTA, YTB	Yta, Ytb
Lutheran	**LUA, LUB**	**Lua, Lub**

COMPONENTES Y ESPECIFICACIONES DEL KIT

IDHPA XT

BLOODchip
IDHPA XT

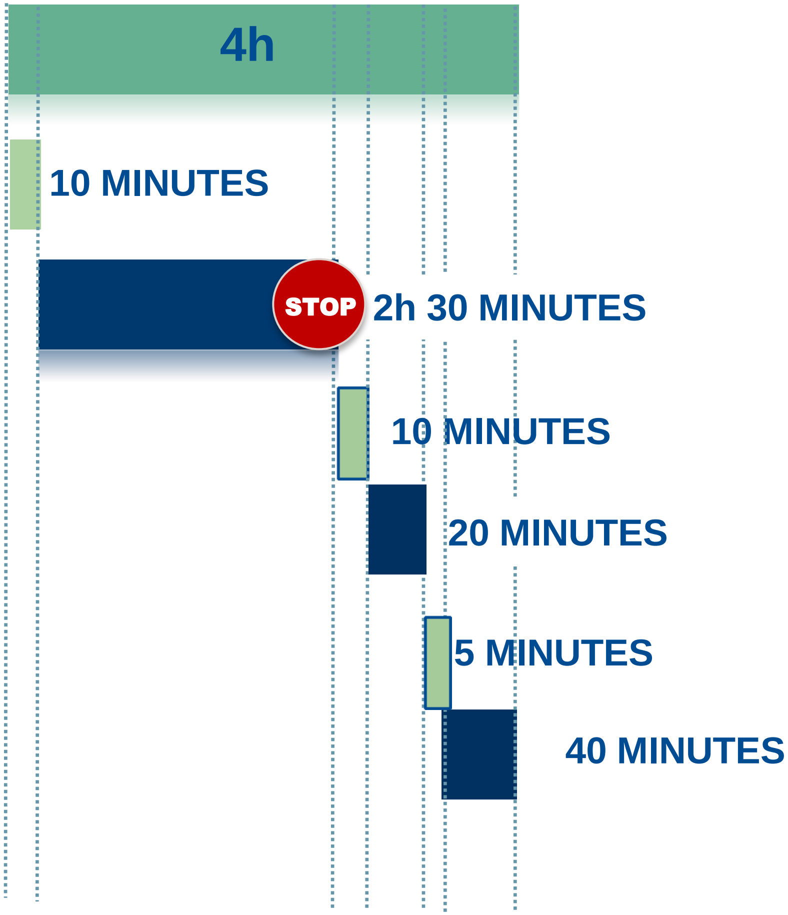
TIPO CELULAR	GRUPO PLAQUETAR	GENOTIPO	FENOTIPO PREDICHO
PLAQUETAS	HPA 1	HPA1a, HPA1b	HPA1a, HPA1b
	HPA 2	HPA2a, HPA2b	HPA2a, HPA2b
	HPA 3	HPA3a, HPA3b	HPA3a, HPA3b
	HPA 4	HPA4a, HPA4b	HPA4a, HPA4b
	HPA 5	HPA5a, HPA5	HPA5a, HPA5
	HPA 6	HPA6a, HPA6bw	HPA6a, HPA6bw
	HPA 7	HPA7a, HPA7bw	HPA7a, HPA7bw
	HPA 8	HPA8a, HPA8bw	HPA8a, HPA8bw
	HPA 9	HPA9a, HPA9bw	HPA9a, HPA9bw
	HPA 10	HPA10a, HPA10bw	HPA10a, HPA10bw
	HPA 11	HPA11a, HPA11bw	HPA11a, HPA11bw
	HPA 15	HPA15a, HPA15b	HPA15a, HPA15b

13 POLIMORFISMOS (12 Antígenos Plaquetarios) analizados:
HPA 1-11 y HPA 15

CONTENIDO 1 kit: 48 determinaciones/kit

VELOCIDAD DE PROCESADO: hasta 96 muestras/test, 30 minutos manipulación manual, 4,5 horas de tiempo de procesado

PROCEDURE OVERVIEW



OVERALL TIME 4h

PCR SET-UP 10 MINUTES

PCR PROGRAM STOP 2h 30 MINUTES

HYB SET-UP 10 MINUTES

HYB PROGRAM 20 MINUTES

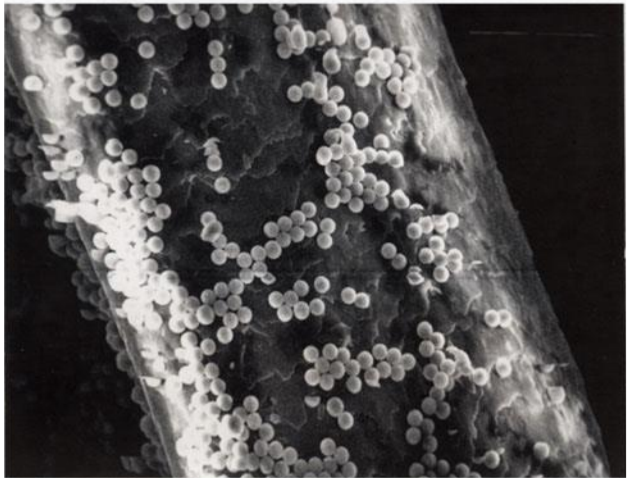
LABELING 5 MINUTES

DATA ANALYSIS 40 MINUTES

30’ TOTAL HANDS ON TIME

Luminex - Tecnología XMAP

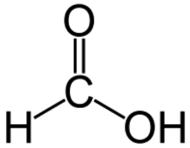
ID-CORE XT™ RUO utiliza tecnología Luminex xMAP® basada en microesferas.



SEM photo of 3.4 micron particles on human hair, 1000x

- 5.6 micron, microesferas de poliestireno

- Superficie Carboxilada

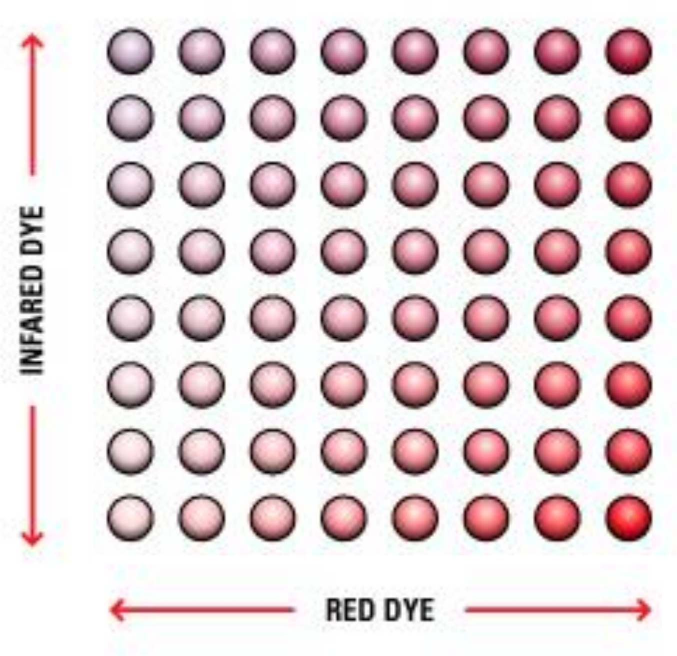


- Microesferas
  - Suspensión en medio liquido
  - Cinética rápida

Tecnología

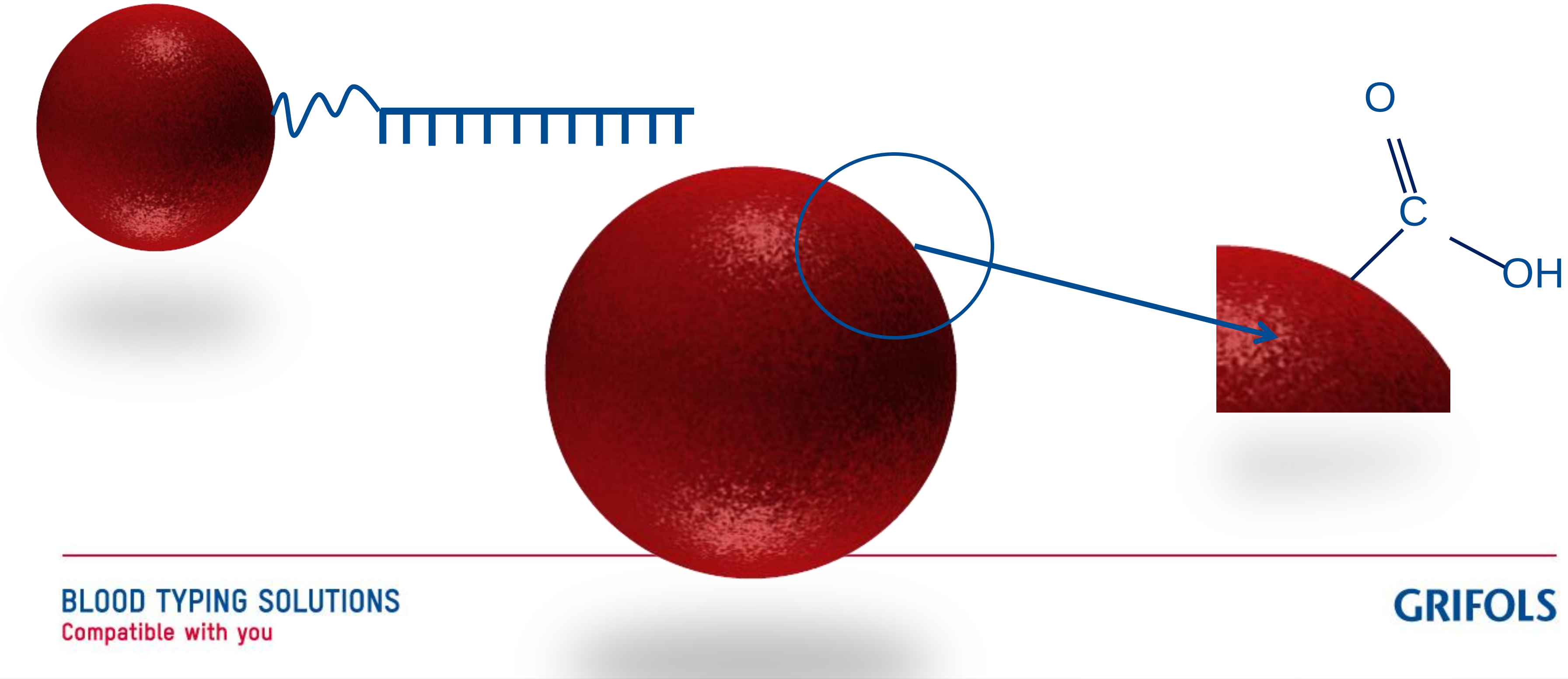
- **Tecnología xMAP : 100 conjuntos de distintas microesferas coloridas**

  - Utilizamos una combinación de dos colorantes para distinguir un conjunto de microesferas de otro
  - Basado en proporciones de colorantes, cada conjunto de microesferas exhibe una fluorescencia única en rojo e infrarrojo
  - Todas las microesferas que tienen una relación de color particular, pertenecen a un conjunto de microesferas específico que es identificado por número de identificación único



ACOPLAMIENTO

Son acopladas moléculas biológicas de captura en la superficie de la microesfera a través de reacciones químicas.

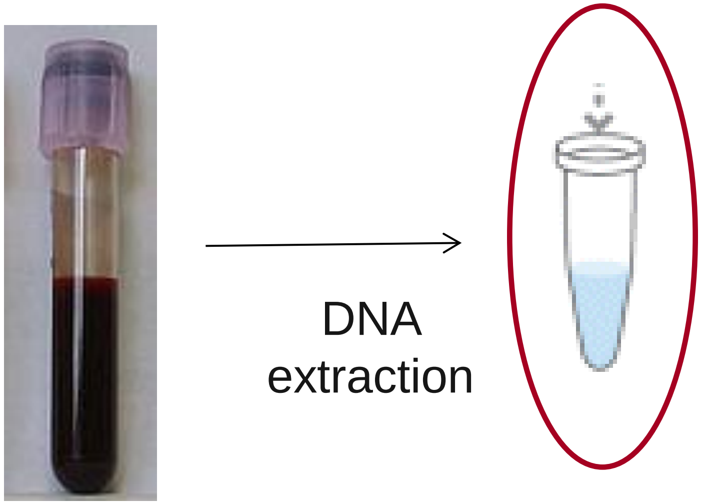


Principio del teste – Bloodchip ID

Protocolo

MUESTRA

DNA genómico extraído de la sangre EDTA

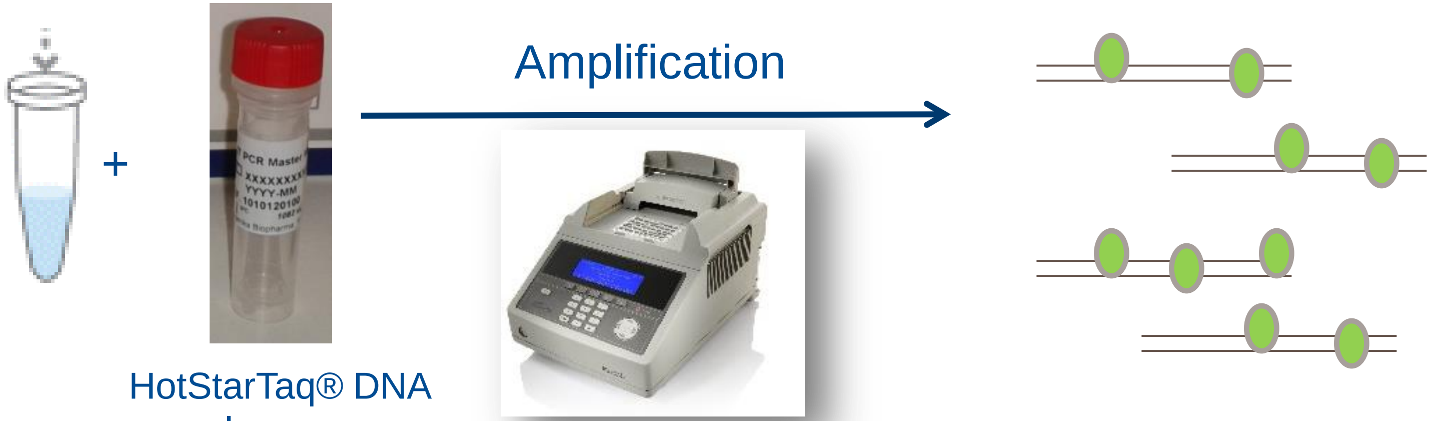


DNA is our starting material

DNA extraction

AMPLIFICACIÓN

DNA genómico extraído de la sangre EDTA es amplificado y biotinilado por multiplex PCR



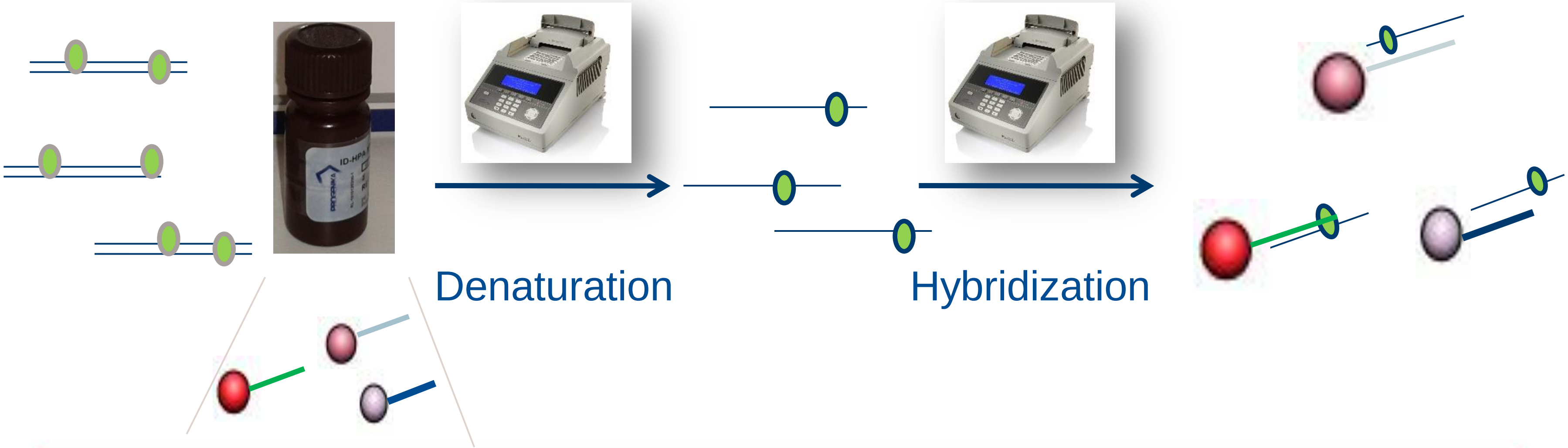
+

Amplification

HotStarTaq® DNA polymerase

HYBRIDIZACIÓN

Productos de PCR son desnaturalizados y hibridados con probes de oligonucleótidos acopladas a microesferas codificadas por color.

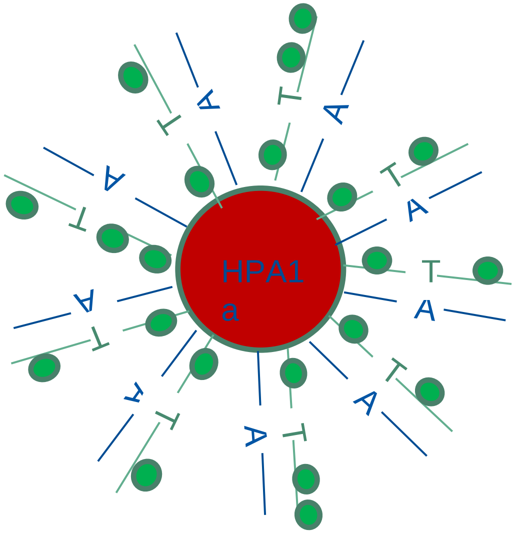


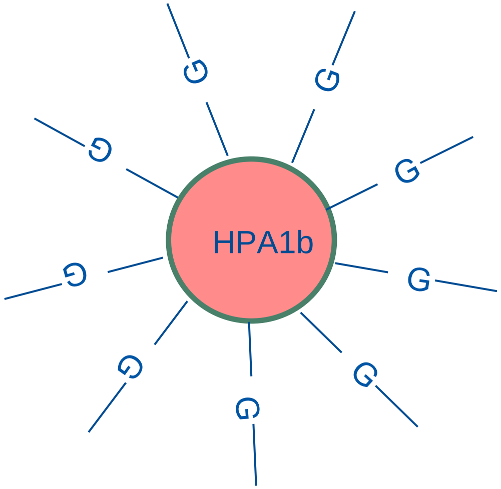
Denaturation

Hybridization

HYBRIDIZACIÓN

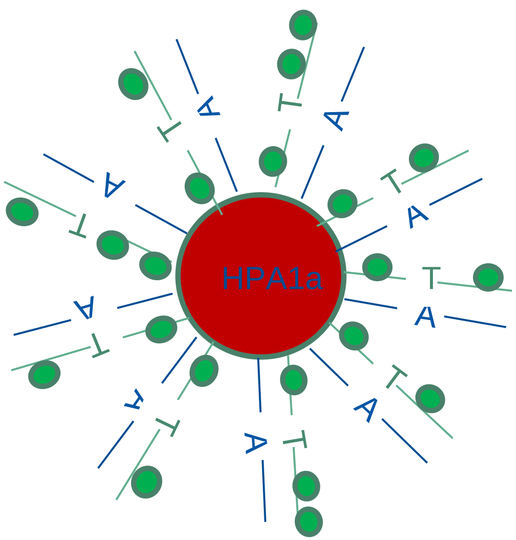
HOMOZYGOUS HPA1A/1A

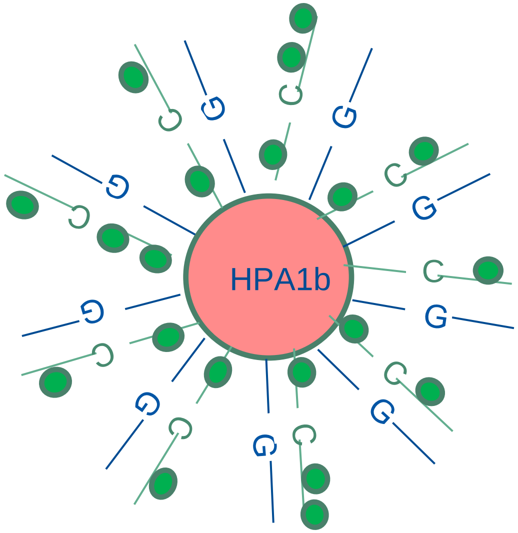

HPA1
a
A
T
A
T
A
T
A
T
A
T
A
T
A
T
A
T
A
T


HPA1b
G
G
G
G
G
G
G
G
G
G

HYBRIDIZACIÓN

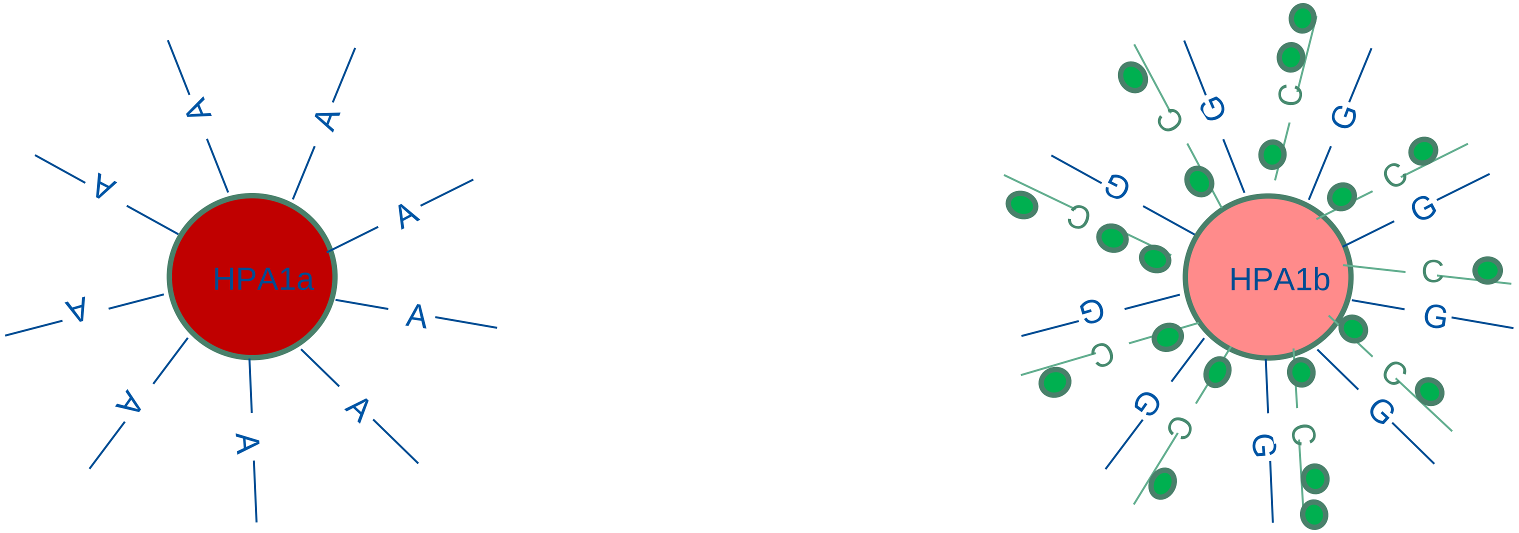
HETEROZYGOUS HPA1A/1B


HPA1a
A
T
A
T
A
T
A
T
A
T
A
T
A
T
A
T
A
T


HPA1b
G
C
G
C
G
C
G
C
G
C
G
C
G
C
G
C
G
C

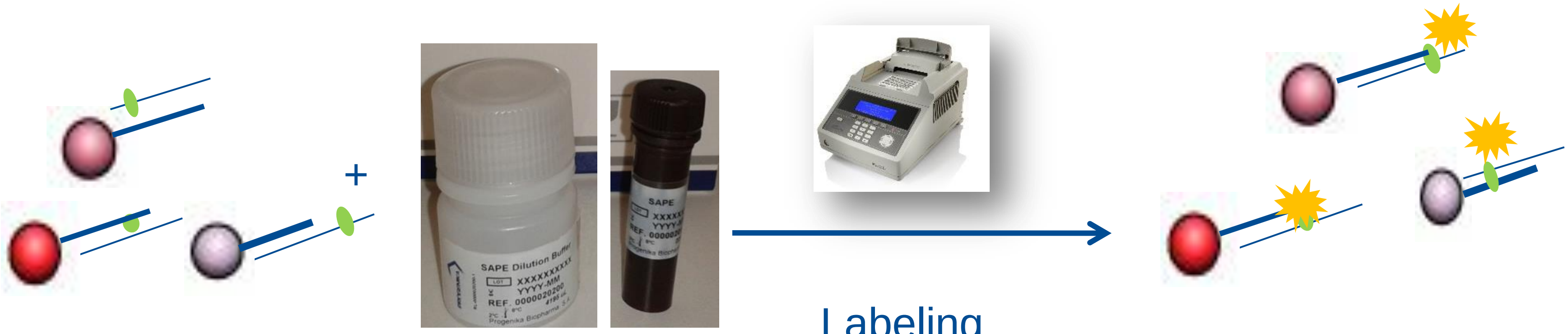
HYBRIDIZACIÓN

HOMOZYGOUS HPA1B/1B


HPA1a
A
A
A
A
A
A
A
A
A
HPA1b
G
C
G
C
G

MARCAJE

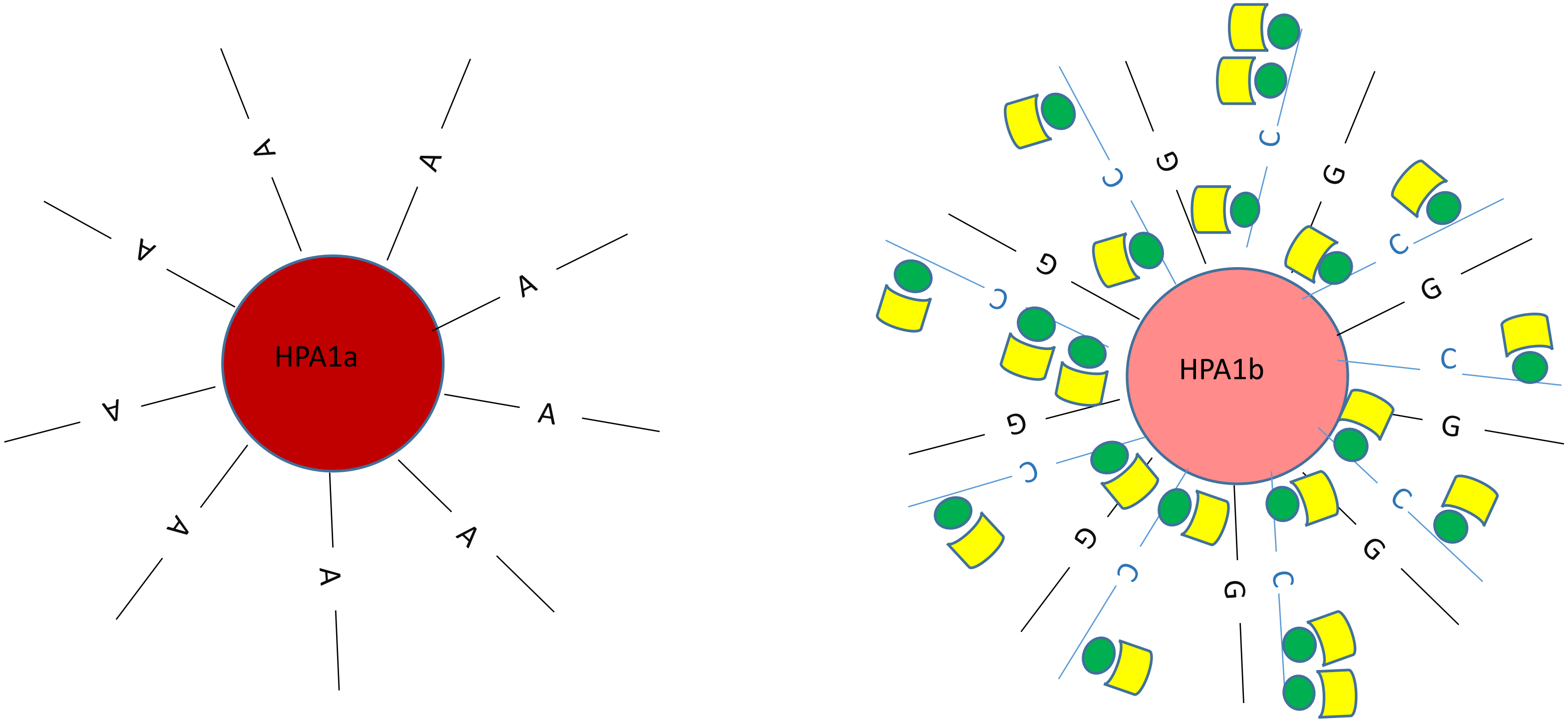
DNA hibridado es marcado con conjugado fluorescente.


+
SAPE Dilution Buffer
SAPE

Labeling

MARCAJE

SAPE binds to biotin


HPA1a
A
A
A
A
A
A
A
A
A
HPA1b
G
C
G
C
G
C
G
C
G
C
G
C
G
C
G
C
G
C

DETECCIÓN DE LA SEÑAL

La señal resultante es detectado a través del sistema Luminex® 100/200™.

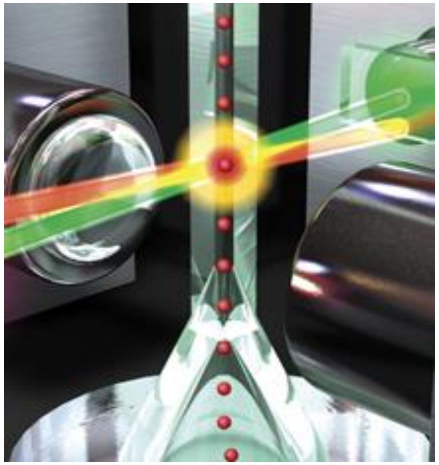
Luminex 100
Luminex SD

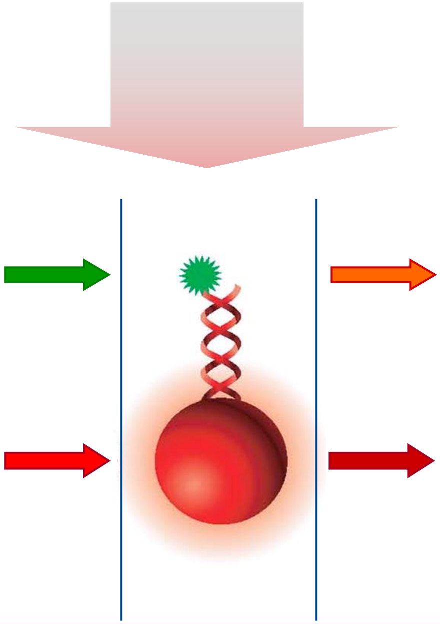
CUANTIFICACIÓN

Coloración Rojo/Infrarrojo : Identificación de microesferas

fluorescencia verde: Cuantificación da la razón de hibridación

Ambos señales permiten la detección de la presencia/ausencia de un polimorfismo





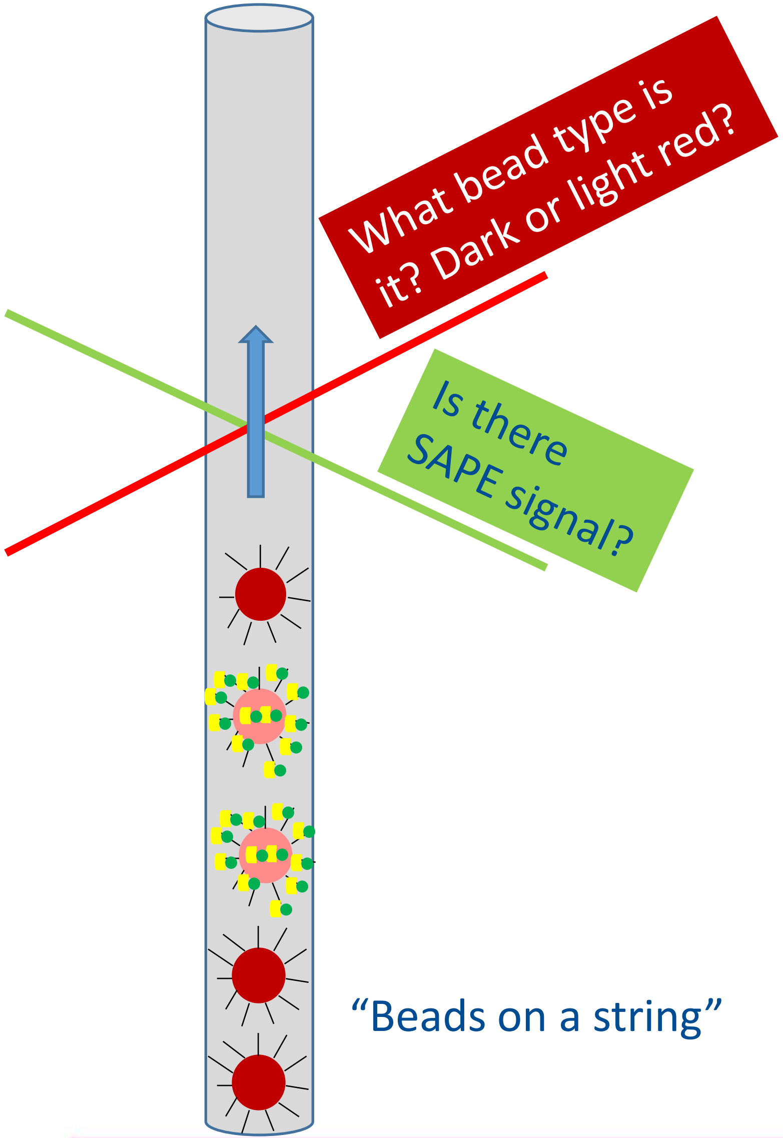
Interrogate label with green laser (525 nm)

Quantify binding events

Interrogate bead with red laser (635 nm)

Identify bead region based on internal dye concentrations

SEÑAL DETECTAD0 POR LUMINEX



What bead type is it? Dark or light red?

Is there SAPE signal?

“Beads on a string”

Bead type 1 (HPA 1a) → No SAPE signal

BEAD COUNTS

MFI signal

Bead type 2 (HPA 1b) → SAPE signal

Sample is HPA1b/1b

When there are 30 beads of each red type, we stop counting

ANALISIS DEL RESULTADO

Data Acquisition

Luminex® System

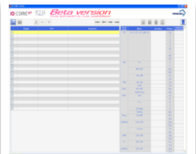
Raw Data Input

BEAD COUNTS

MFI signal

(Median Fluorescence Intensity)

Data Analysis



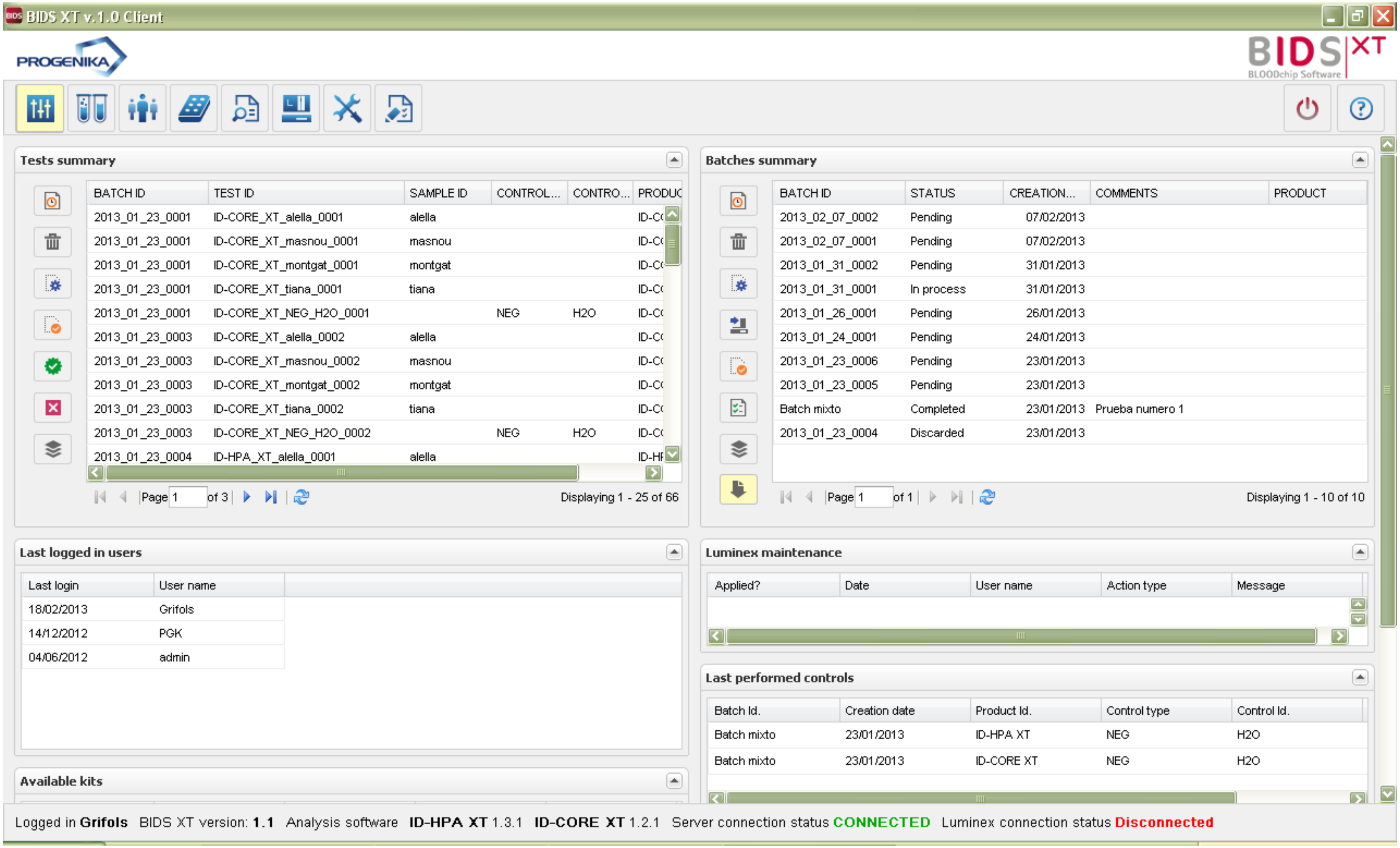
BIDS XT

BLOODchip ID Software XT (BIDS XT) :

Utiliza la MFI y cuentas de beads obtenidas en el ensayo para la determinación del genotipo para cada uno de los polimorfismos detectados por el teste.

BIDS^{XT}

BLOODchip® ID software



Tests summary

BATCH ID	TEST ID	SAMPLE ID	CONTROL...	CONTRO...	PRODUC
2013_01_23_0001	ID-CORE_XT_alella_0001	alella			ID-C
2013_01_23_0001	ID-CORE_XT_masnou_0001	masnou			ID-C
2013_01_23_0001	ID-CORE_XT_montgat_0001	montgat			ID-C
2013_01_23_0001	ID-CORE_XT_tiana_0001	tiana			ID-C
2013_01_23_0001	ID-CORE_XT_NEG_H2O_0001		NEG	H2O	ID-C
2013_01_23_0003	ID-CORE_XT_alella_0002	alella			ID-C
2013_01_23_0003	ID-CORE_XT_masnou_0002	masnou			ID-C
2013_01_23_0003	ID-CORE_XT_montgat_0002	montgat			ID-C
2013_01_23_0003	ID-CORE_XT_tiana_0002	tiana			ID-C
2013_01_23_0003	ID-CORE_XT_NEG_H2O_0002		NEG	H2O	ID-C
2013_01_23_0004	ID-HPA_XT_alella_0001	alella			ID-H

Page 1 of 3

Displaying 1 - 25 of 66

Batches summary

BATCH ID	STATUS	CREATION...	COMMENTS	PRODUCT
2013_02_07_0002	Pending	07/02/2013		
2013_02_07_0001	Pending	07/02/2013		
2013_01_31_0002	Pending	31/01/2013		
2013_01_31_0001	In process	31/01/2013		
2013_01_26_0001	Pending	26/01/2013		
2013_01_24_0001	Pending	24/01/2013		
2013_01_23_0006	Pending	23/01/2013		
2013_01_23_0005	Pending	23/01/2013		
Batch mixto	Completed	23/01/2013	Prueba numero 1	
2013_01_23_0004	Discarded	23/01/2013		

Page 1 of 1

Displaying 1 - 10 of 10

Last logged in users

Last login	User name
18/02/2013	Grifols
14/12/2012	PGK
04/06/2012	admin

Luminex maintenance

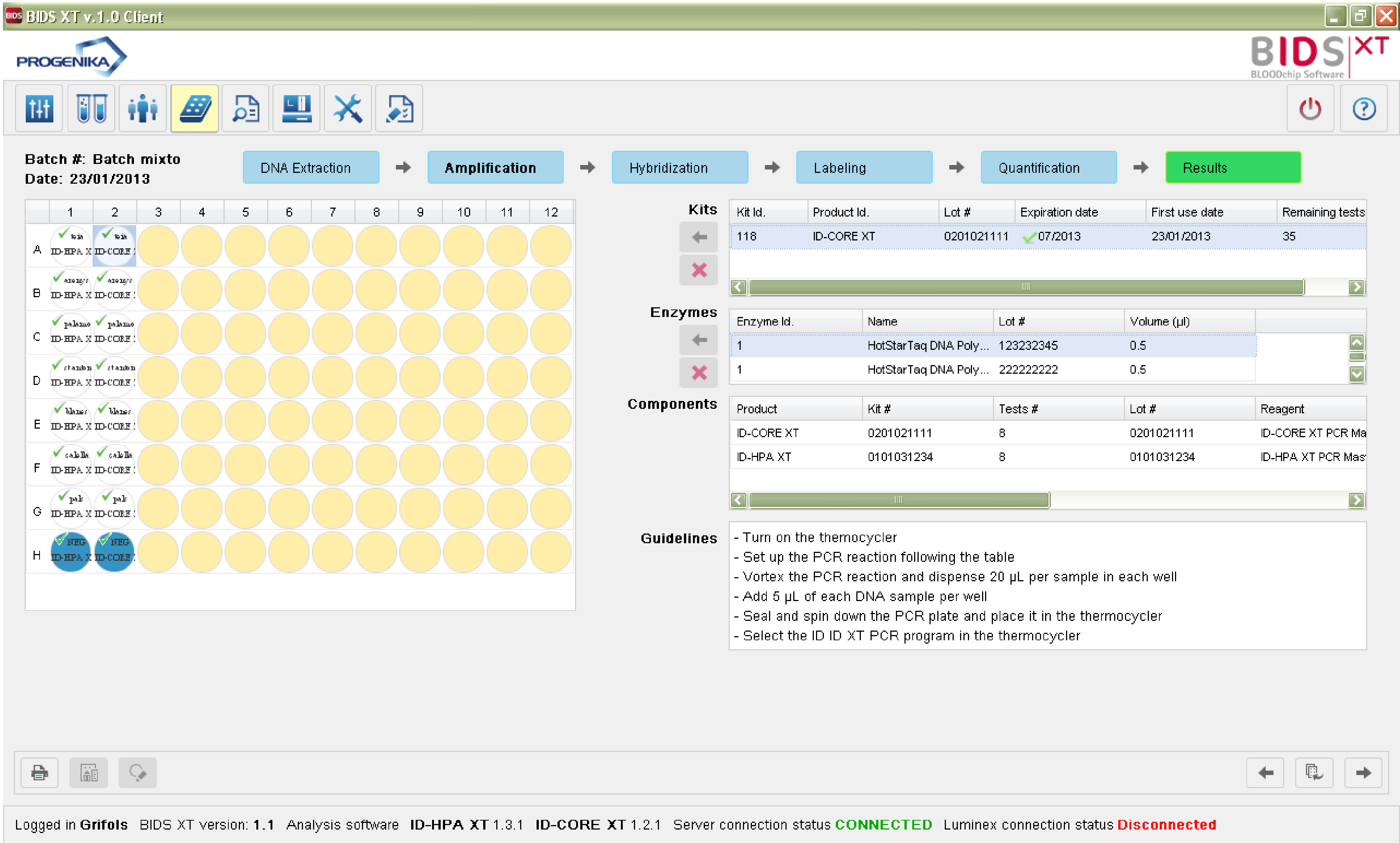
Applied?	Date	User name	Action type	Message

Last performed controls

Batch Id.	Creation date	Product Id.	Control type	Control Id.
Batch mixto	23/01/2013	ID-HPA XT	NEG	H2O
Batch mixto	23/01/2013	ID-CORE XT	NEG	H2O

Available kits

Logged in **Grifols** BIDS XT version: **1.1** Analysis software **ID-HPA XT** 1.3.1 **ID-CORE XT** 1.2.1 Server connection status **CONNECTED** Luminex connection status **Disconnected**


BIDS XT v.1.0 Client
PROGENIKA
BIDS XT
BLOODchip Software
DNA Extraction
Amplification
Hybridization
Labeling
Quantification
Results
Kits
Enzymes
Components
Guidelines

Batch #: Batch mixto
Date: 23/01/2013

Kits

Kit Id.	Product Id.	Lot #	Expiration date	First use date	Remaining tests
118	ID-CORE XT	0201021111	✓ 07/2013	23/01/2013	35

Enzymes

Enzyme Id.	Name	Lot #	Volume (µl)
1	HotStarTaq DNA Poly...	123232345	0.5
1	HotStarTaq DNA Poly...	222222222	0.5

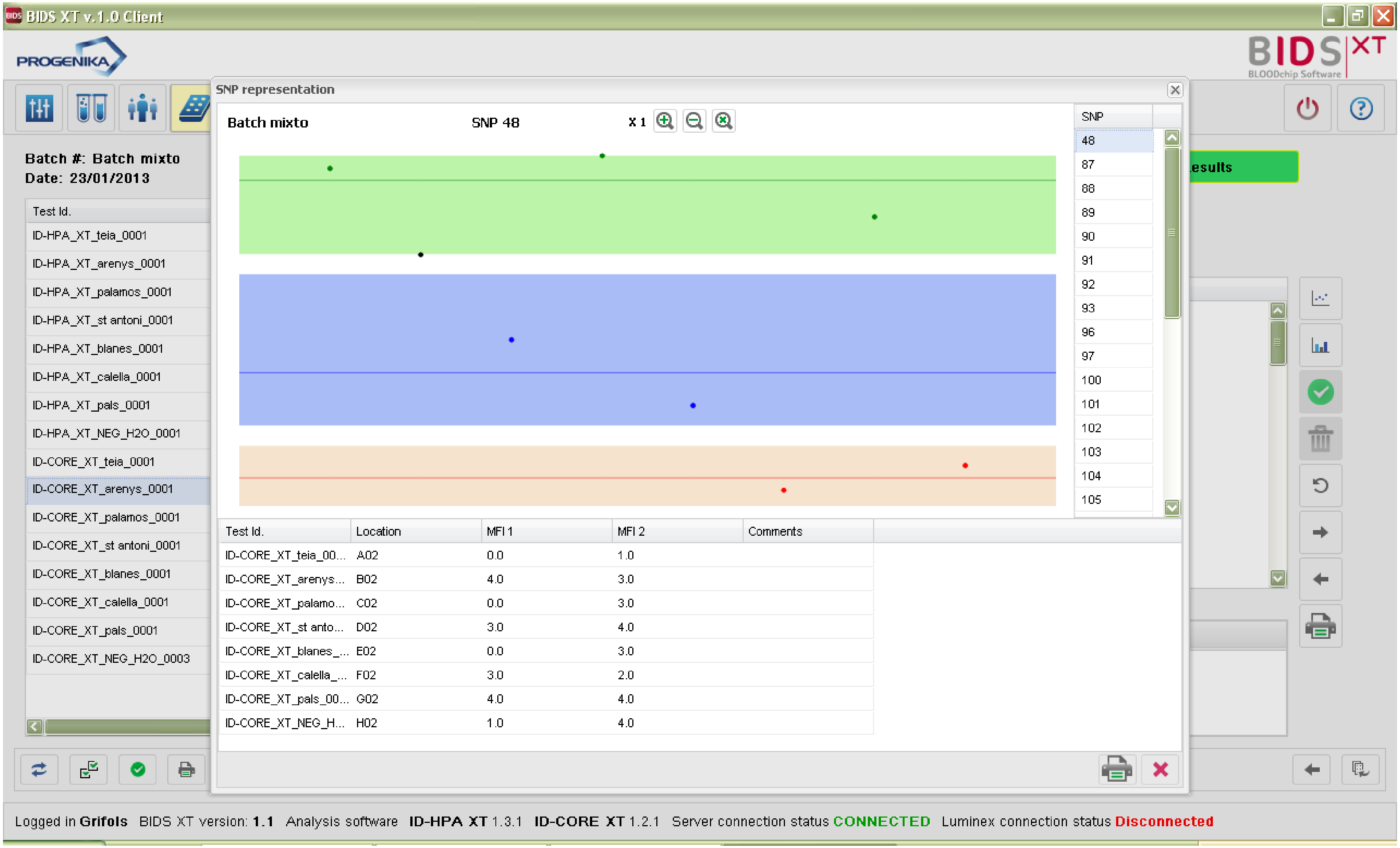
Components

Product	Kit #	Tests #	Lot #	Reagent
ID-CORE XT	0201021111	8	0201021111	ID-CORE XT PCR Ma
ID-HPA XT	0101031234	8	0101031234	ID-HPA XT PCR Mas

Guidelines

- Turn on the themocycler
- Set up the PCR reaction following the table
- Vortex the PCR reaction and dispense 20 µL per sample in each well
- Add 5 µL of each DNA sample per well
- Seal and spin down the PCR plate and place it in the thermocycler
- Select the ID ID XT PCR program in the thermocycler

Logged in **Grifols** BIDS XT version: **1.1** Analysis software **ID-HPA XT** 1.3.1 **ID-CORE XT** 1.2.1 Server connection status **CONNECTED** Luminex connection status **Disconnected**



Batch #: Batch mixto
Date: 23/01/2013

Test Id.
ID-HPA_XT_teia_0001
ID-HPA_XT_arenys_0001
ID-HPA_XT_palamos_0001
ID-HPA_XT_st antoni_0001
ID-HPA_XT_blanes_0001
ID-HPA_XT_calella_0001
ID-HPA_XT_pals_0001
ID-HPA_XT_NEG_H2O_0001
ID-CORE_XT_teia_0001
ID-CORE_XT_arenys_0001
ID-CORE_XT_palamos_0001
ID-CORE_XT_st antoni_0001
ID-CORE_XT_blanes_0001
ID-CORE_XT_calella_0001
ID-CORE_XT_pals_0001
ID-CORE_XT_NEG_H2O_0003

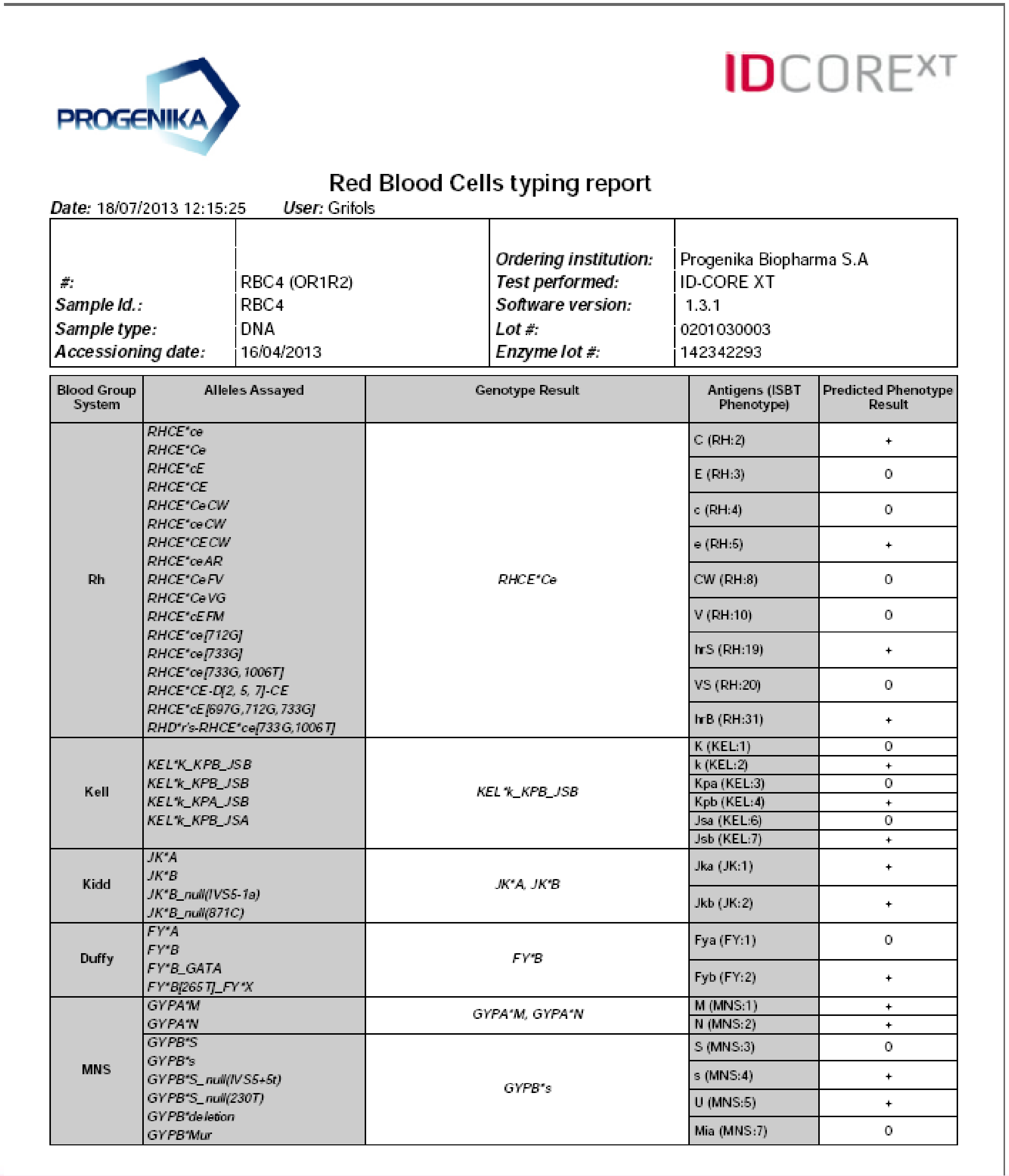
Batch mixto SNP 48 x 1

SNP
48
87
88
89
90
91
92
93
96
97
100
101
102
103
104
105

Test Id.	Location	MFI 1	MFI 2	Comments
ID-CORE_XT_teia_00...	A02	0.0	1.0	
ID-CORE_XT_arenys...	B02	4.0	3.0	
ID-CORE_XT_palamo...	C02	0.0	3.0	
ID-CORE_XT_st anto...	D02	3.0	4.0	
ID-CORE_XT_blanes_...	E02	0.0	3.0	
ID-CORE_XT_calella_...	F02	3.0	2.0	
ID-CORE_XT_pals_00...	G02	4.0	4.0	
ID-CORE_XT_NEG_H...	H02	1.0	4.0	

Logged in **Grifols** BIDS XT version: **1.1** Analysis software **ID-HPA XT** 1.3.1 **ID-CORE XT** 1.2.1 Server connection status **CONNECTED** Luminex connection status **Disconnected**

REPORT



PROGENIKA

IDCORE XT

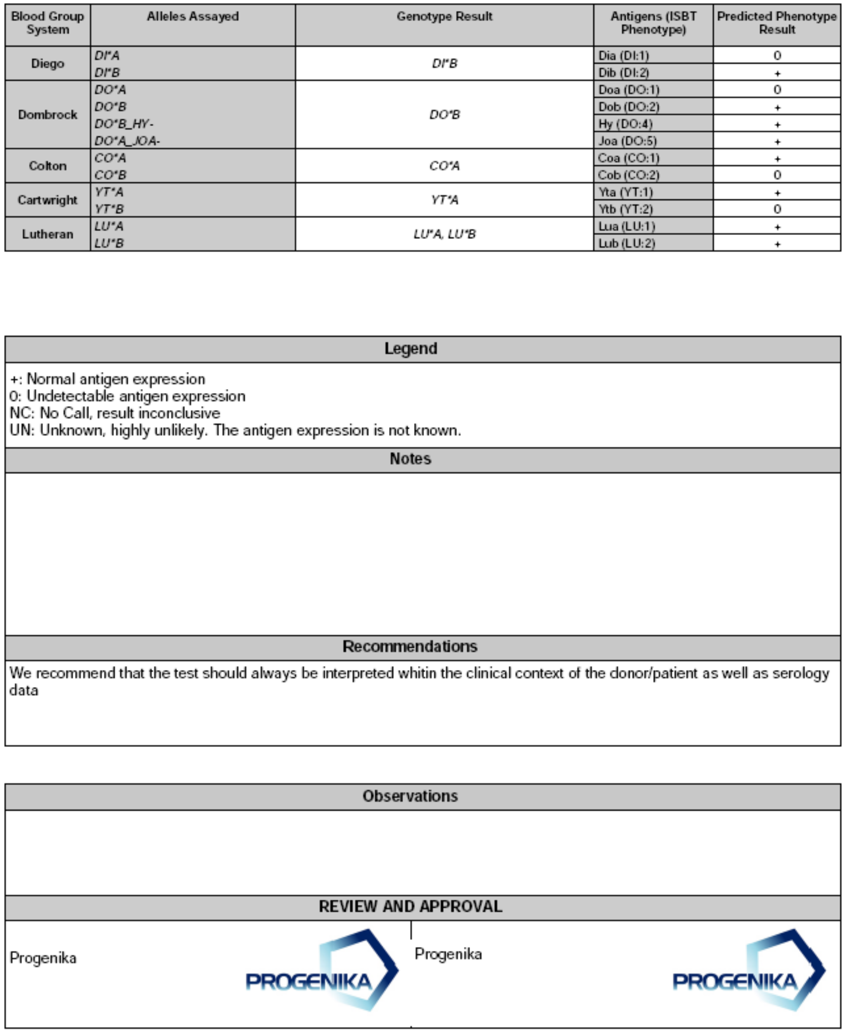
Red Blood Cells typing report

Date: 18/07/2013 12:15:25 **User:** Grifols

		Ordering institution:	Progenika Biopharma S.A
#:	RBC4 (OR1R2)	**Test performed:**	ID-CORE XT
Sample Id.:	RBC4	**Software version:**	1.3.1
Sample type:	DNA	**Lot #:**	0201030003
Accessioning date:	16/04/2013	**Enzyme lot #:**	142342293

Blood Group System	Alleles Assayed	Genotype Result	Antigens (ISBT Phenotype)	Predicted Phenotype Result
Rh	RHCE*ce RHCE*Ce RHCE*cE RHCE*CE RHCE*CeCW RHCE*ceCW RHCE*CECW RHCE*ceAR RHCE*CeFV RHCE*CeVG RHCE*cEFM RHCE*ce[712G] RHCE*ce[733G] RHCE*ce[733G, 1006T] RHCE*CE-D[2, 5, 7]-CE RHCE*cE[697G,712G, 733G] RHD*r's-RHCE*ce[733G,1006T]	RHCE*Ce	C (RH:2)	+
			E (RH:3)	0
			c (RH:4)	0
			e (RH:5)	+
			CW (RH:8)	0
			V (RH:10)	0
			hrS (RH:19)	+
			VS (RH:20)	0
			hrB (RH:31)	+
Kell	KEL*K_KPB_JSB KEL*k_KPB_JSB KEL*k_KPA_JSB KEL*k_KPB_JSA	KEL*k_KPB_JSB	K (KEL:1)	0
			k (KEL:2)	+
			Kpa (KEL:3)	0
			Kpb (KEL:4)	+
			Jsa (KEL:6)	0
			Jsb (KEL:7)	+
Kidd	JK*A JK*B JK*B_null(IVS5-1a) JK*B_null(871C)	JK*A, JK*B	Jka (JK:1)	+
			Jkb (JK:2)	+
Duffy	FY*A FY*B FY*B_GATA FY*B[265T]_FY*X	FY*B	Fya (FY:1)	0
			Fyb (FY:2)	+
MNS	GYPA*M GYPA*N	GYPA*M, GYPA*N	M (MNS:1)	+
			N (MNS:2)	+
	GYPB*S GYPB*s GYPB*S_null(IVS5+5t) GYPB*S_null(230T) GYPB*deletion GYPB*Mur	GYPB*s	S (MNS:3)	0
			s (MNS:4)	+
			U (MNS:5)	+
			Mia (MNS:7)	0

REPORT



Blood Group System	Alleles Assayed	Genotype Result	Antigens (ISBT Phenotype)	Predicted Phenotype Result
Diego	DI*A	DI*B	Dia (DI:1)	0
	DI*B		Dib (DI:2)	+
Dombrock	DO*A	DO*B	Doa (DO:1)	0
	DO*B		Dob (DO:2)	+
	DO*B_HY-		Hy (DO:4)	+
	DO*A_JOA-		Joa (DO:5)	+
Colton	CO*A	CO*A	Coa (CO:1)	+
	CO*B		Cob (CO:2)	0
Cartwright	YT*A	YT*A	Yta (YT:1)	+
	YT*B		Ytb (YT:2)	0
Lutheran	LU*A	LU*A, LU*B	Lua (LU:1)	+
	LU*B		Lub (LU:2)	+

Legend

+: Normal antigen expression
0: Undetectable antigen expression
NC: No Call, result inconclusive
UN: Unknown, highly unlikely. The antigen expression is not known.

Notes

Recommendations

We recommend that the test should always be interpreted whitin the clinical context of the donor/patient as well as serology data

Observations

REVIEW AND APPROVAL

Progenika	Progenika

Conclusiones

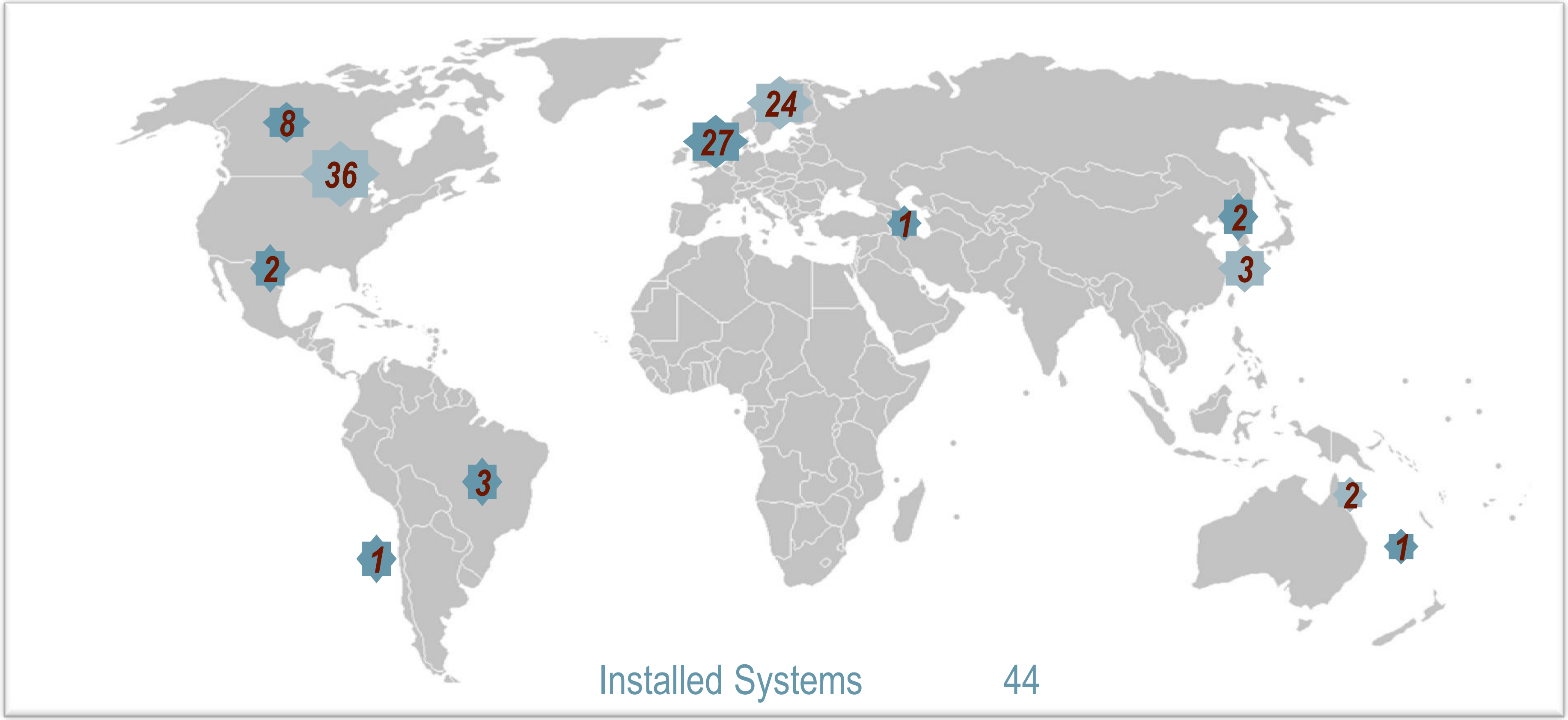
El genotipaje de grupos sanguíneos utilizando BloodChip proporciona resultados fiables en la predicción del fenotipo eritrocitario y plaquetario permitiendo:

1- Mejorar la disponibilidad de productos sanguíneos extensivamente tipificados (base amplias de donantes) para seleccionar unidades compatibles a pacientes dependientes transfusión.

2- Evitar o reducir la aloinmunización frente a antígenos de grupo sanguíneo

3- Reducir la incidencia de reacciones hemolíticas retardadas

BLOODchip Base Instalada


8
36
2
3
1
27
24
1
2
3
2
1

Installed Systems	44
Service Customers	65

Gracias!