

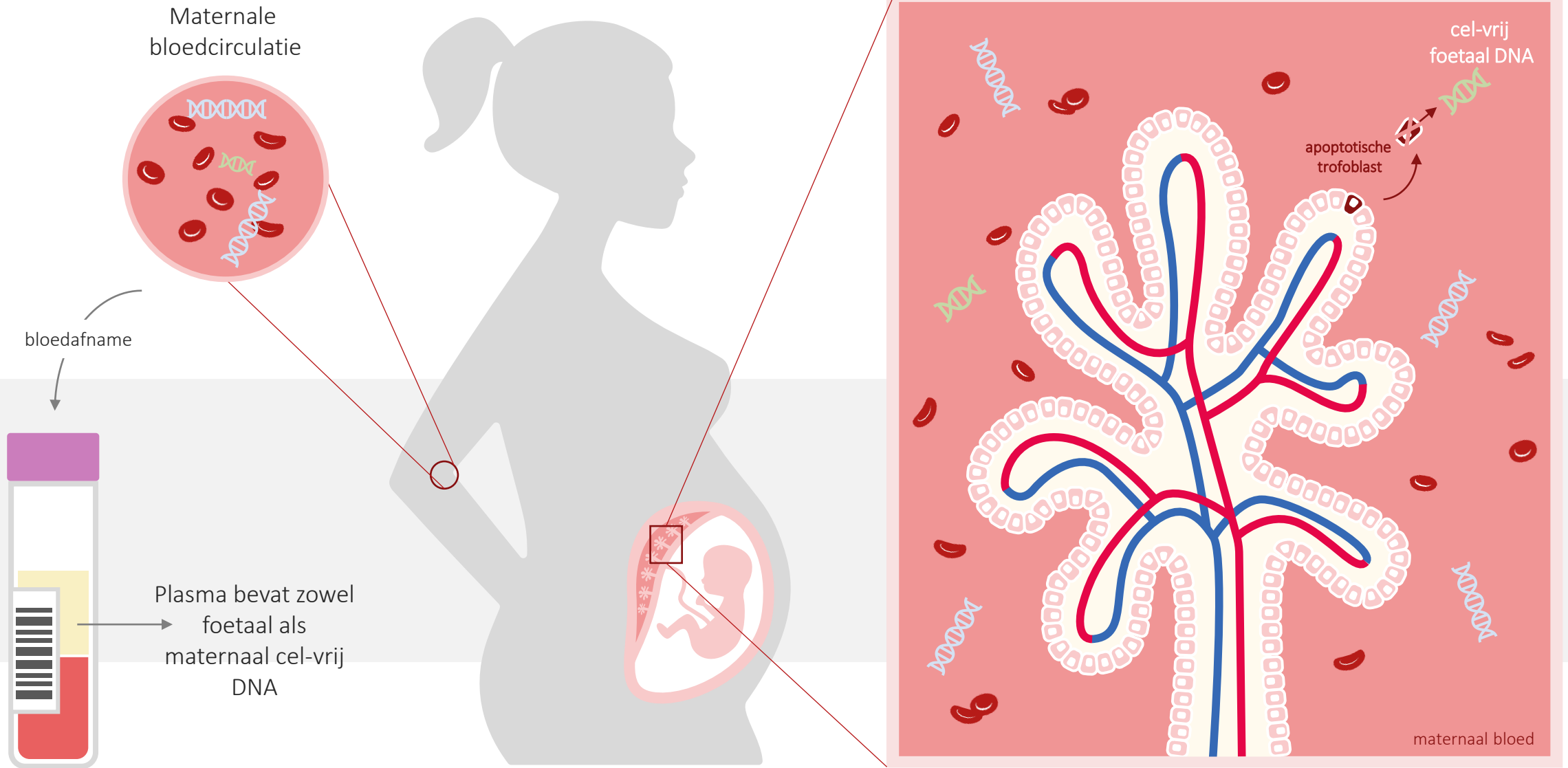
Nieuw platform prenatale bloedgroeyperingen voor Rh en K erythrocytenbloedgroepantigenen en Humane Plaatjes Antigenen met cel-vrij foetaal DNA uit bloedplasma van de moeder

Camilla Calandrini¹, Onno J.H.M. Verhagen², Ahmed Tissoudali¹, Barbera Veldhuisen³, Erik H. van Beers¹, Jessica Vessies¹, Mark Brussee¹, C. Ellen van der Schoot³, Masja de Haas^{1,3,4}

¹Immunohematologie Diagnostiek en ²Immunocytologie, Sanquin Diagnostiek, Amsterdam, ³Experimentele Immunohematologie, Sanquin Research en Landsteiner Lab, AUMC, Amsterdam, ⁴Hematologie, LUMC, Leiden



OORSPRONG CEL-VRIJ FOETAAL DNA



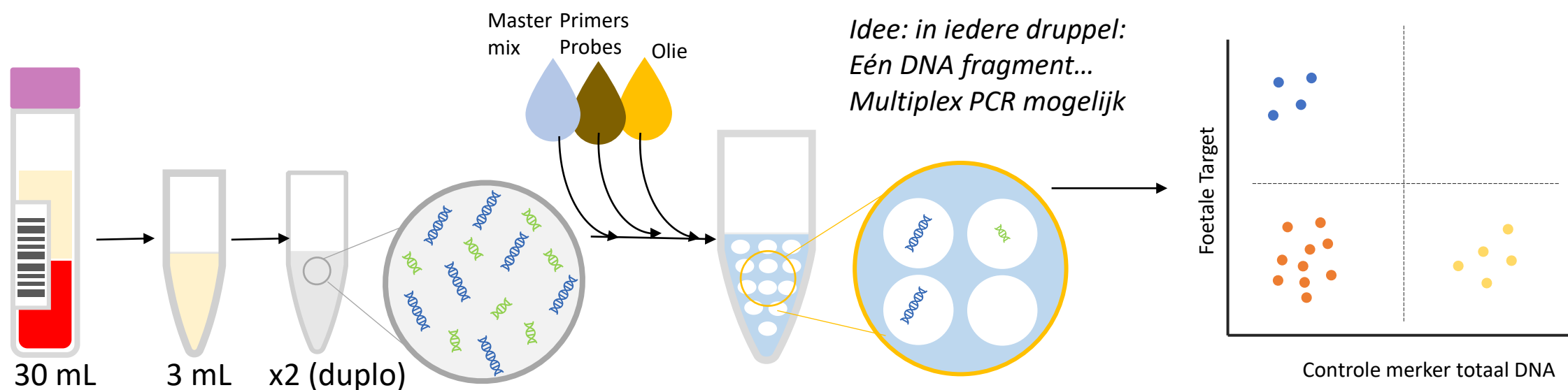


Foetale bloedgroepantigentyping

- Moeder met alloantistoffen: anti-D, -c, -C, -E of K of anti-HPA-1a
- Kind kans op hemolytische ziekte van de foetus en pasgeborene of foetale neonatale alloimmun trombocytopenie
- Kind typeren in periode week 11 tot week 19 om tijdig therapie te starten
- Niet-invasieve foetale genotypering met DNA uit plasma van de moeder sinds 2004
- Uitdagingen:
 - Fout-positieve uitslag: achtergrond amplificatie vanaf DNA van de moeder
 - Fout-negatieve uitslag: lage hoeveelheid foetaal DNA; complexe controles (doorlooptijd 3 tot 4 dagen)



Droplet digital PCR: hoge specificiteit bij juiste DNA input

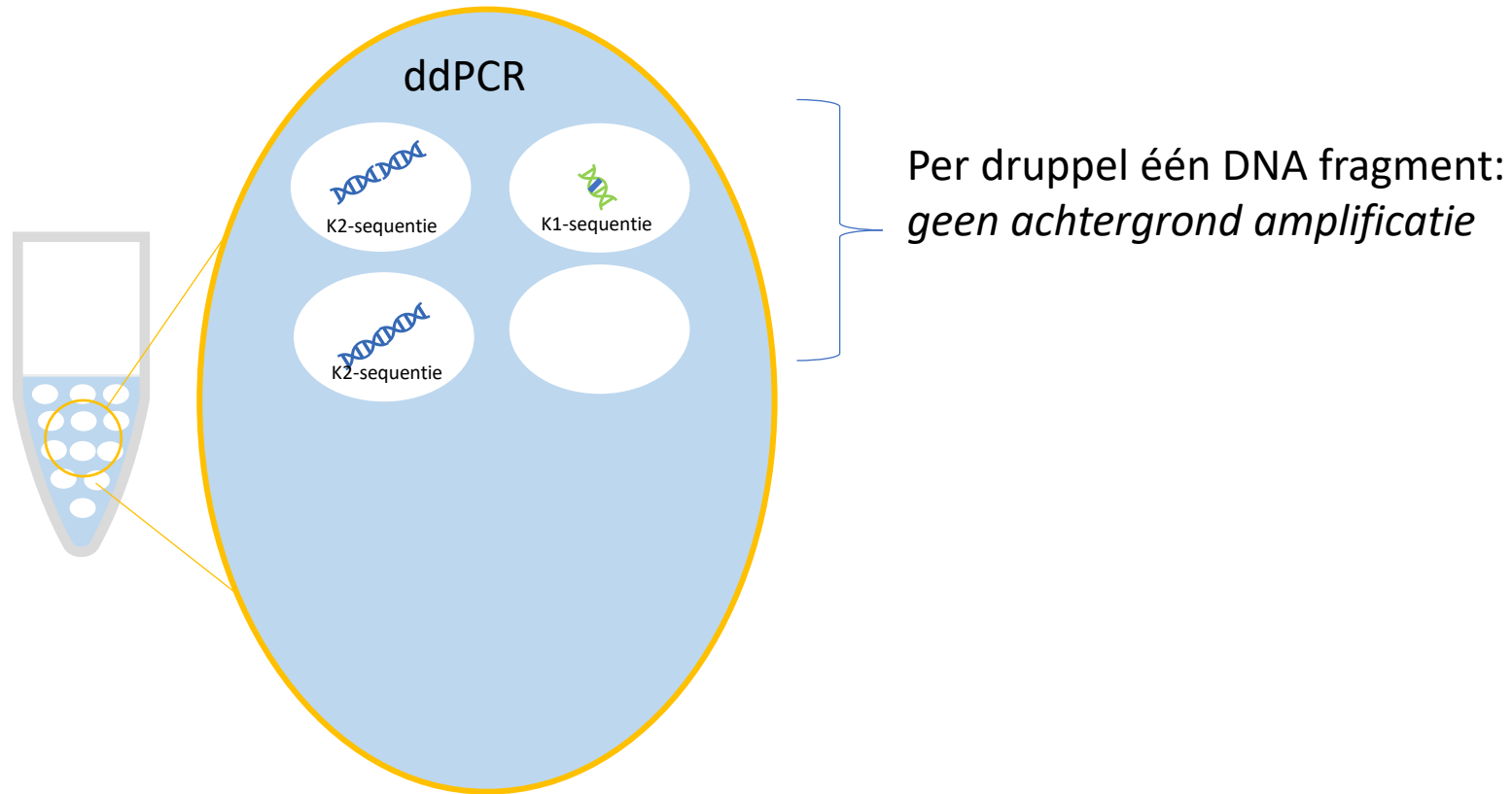


Uitvoering: BioRad ddPCR platform; QuantSoftware voor analyse

Controles: Kwaliteitscontroles ddPCR; uitgebreid panel van in huis controles: positieve en negatieve target controles (gDNA en plasma van niet-zwangere donor; controle op enzymatische digestie bij RASSF1a target)

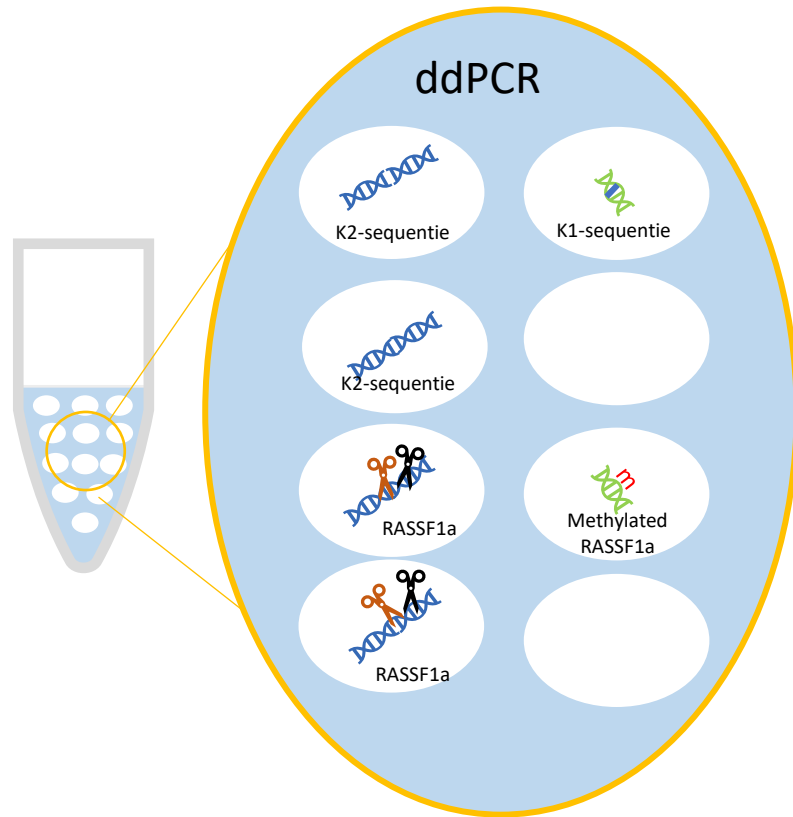


Droplet digital PCR: hoge specificiteit bij juiste DNA input





Droplet digital PCR met universele mRASSF1a controle



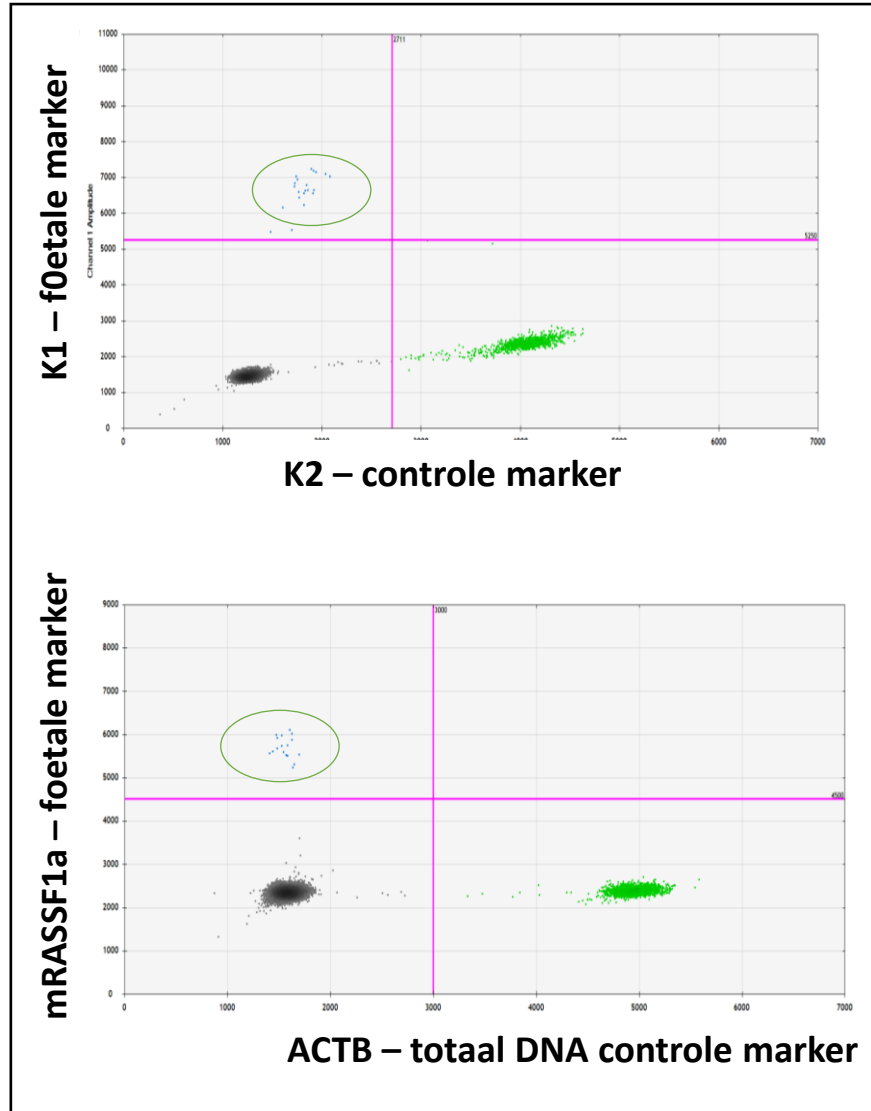
Per druppel één DNA fragment:
geen achtergrond amplificatie

Voorafgaand aan RASSF1a PCR:
DNA digestie met twee methylatie-gevoelige restrictie enzymen
Maternale RASSF1a fragmenten geknipt
Controle in dezelfde PCR-assay: doorlooptijd 2 dagen

Voorbeeld K1 ddPCR resultaat



A



Legend

Gray/black: bottom left quadrant - negative droplets

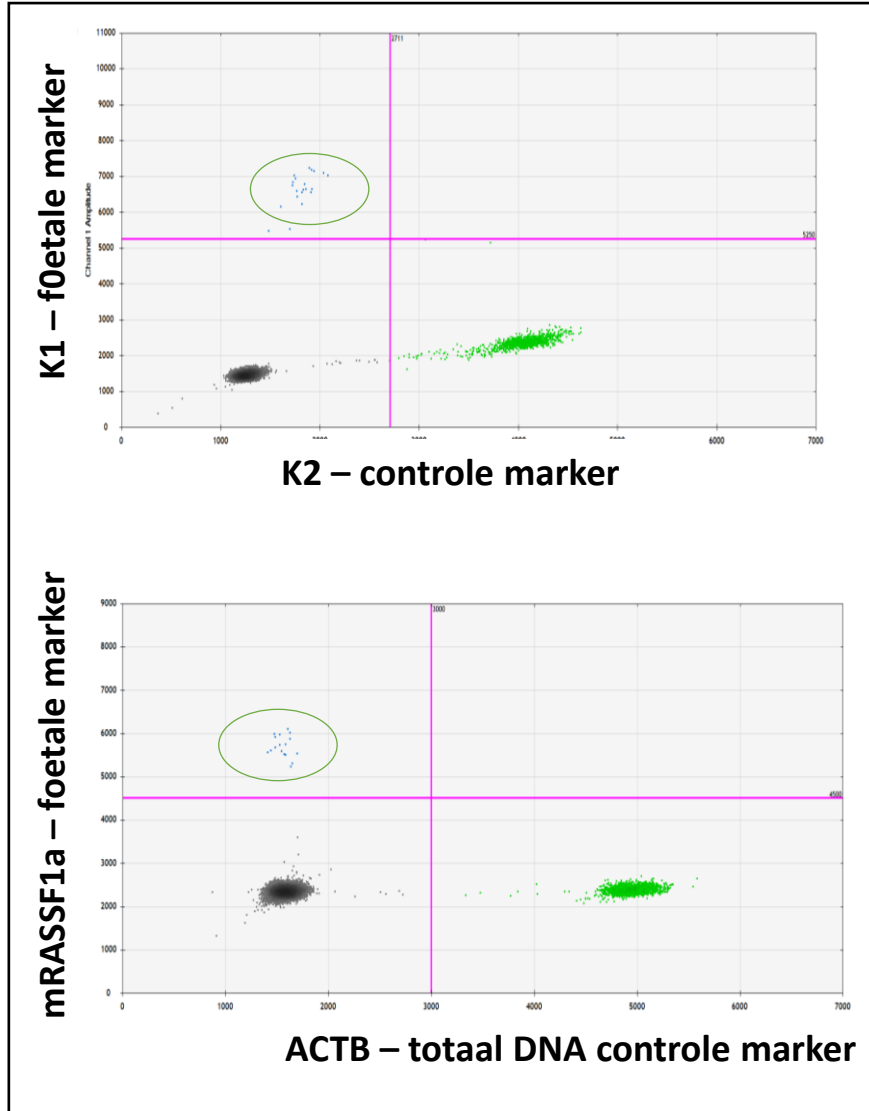
Green: bottom right quadrant – K2/ACTB positive droplets

Blue: top left quadrant – K1/mRASSF1a positive droplets

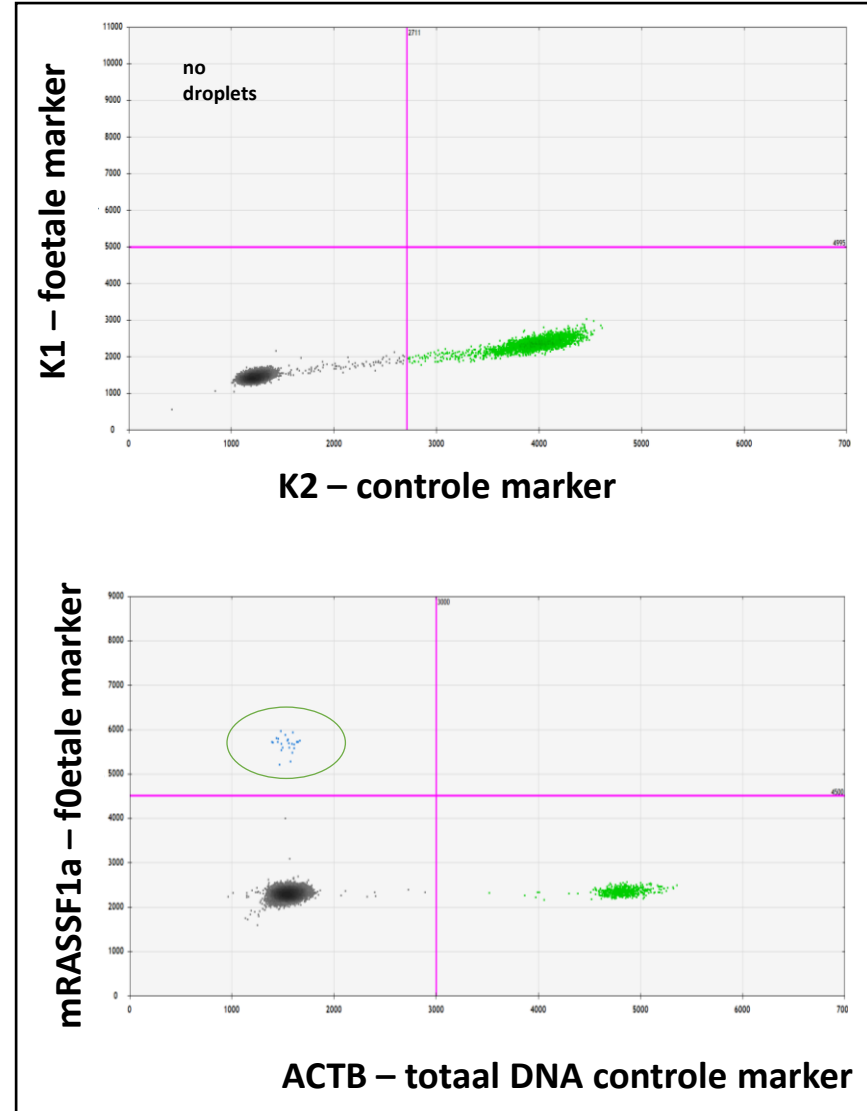


Voorbeeld K1 ddPCR resultaat

A



B



- A. Foetus K1 positief (top), mRASSF1a positief (onder)
- B. Foetus K1 negatief (top), mRASSF1a positief (onder)

Legend

- Gray/black: bottom left quadrant - negative droplets
- Green: bottom right quadrant - K2/ACTB positive droplets
- Blue: top left quadrant - K1/mRASSF1a positive droplets



Prestatie bloedgroeyptypering met ddPCR

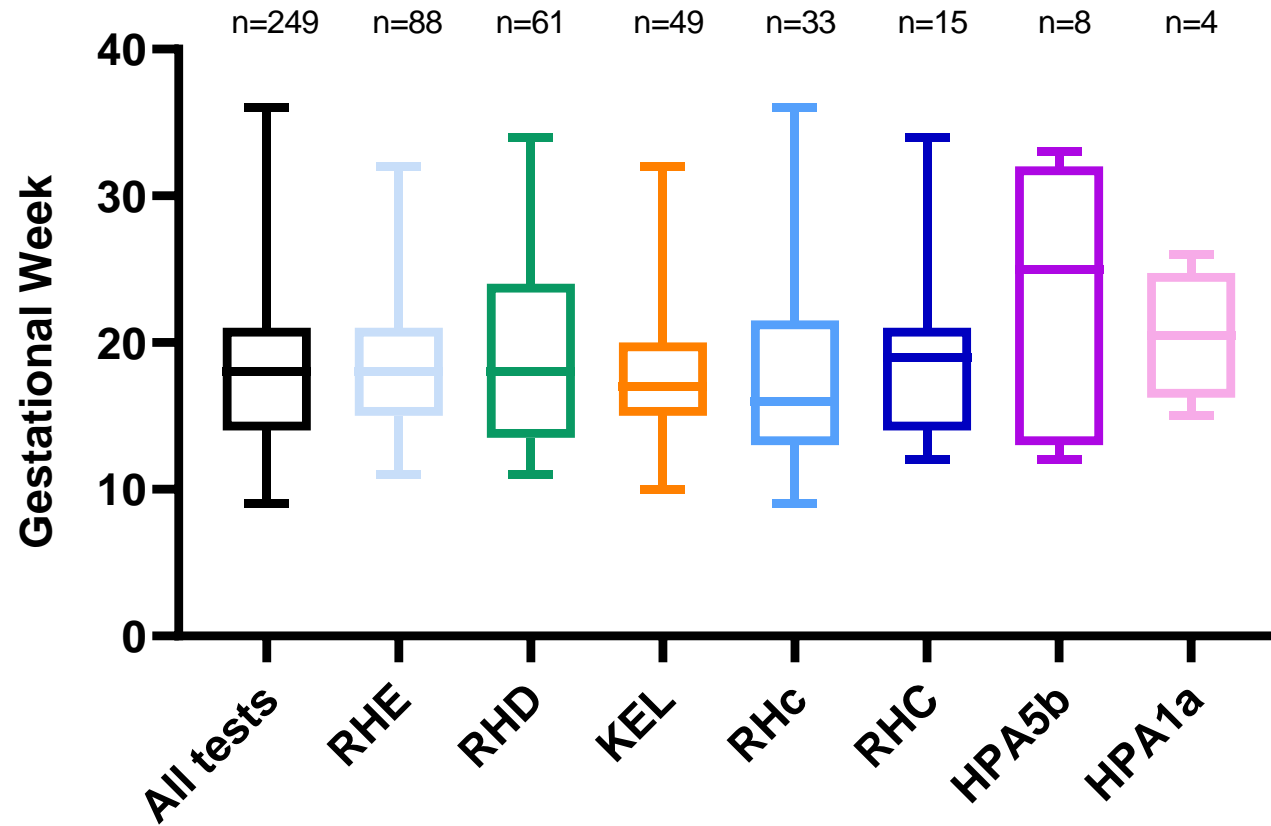
- Van April 2022 tot Maart 2023: 275 aanvragen

RHE	RHD	KEL	RHc	RHC	HPA-1a	HPA-5b
94	62	54	37	16	8	4

- 96% uitslag gerapporteerd;
 - 10x herhaling zelfde sample
- 4% verzoek nieuw sample (9x):
 - herhaald met conclusief resultaat
- Gemiddelde doorlooptijd: 6 dagen (<9 dgn in 94%)

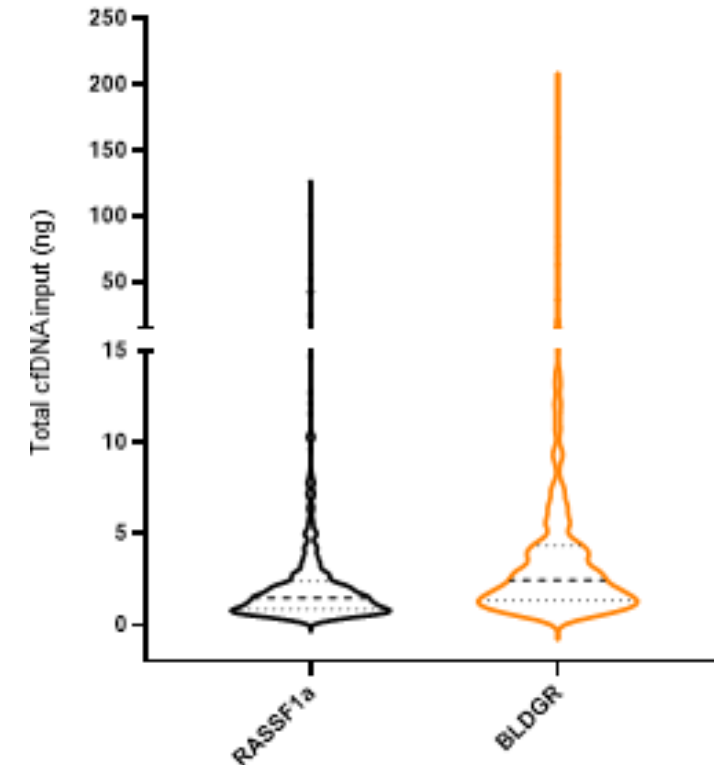
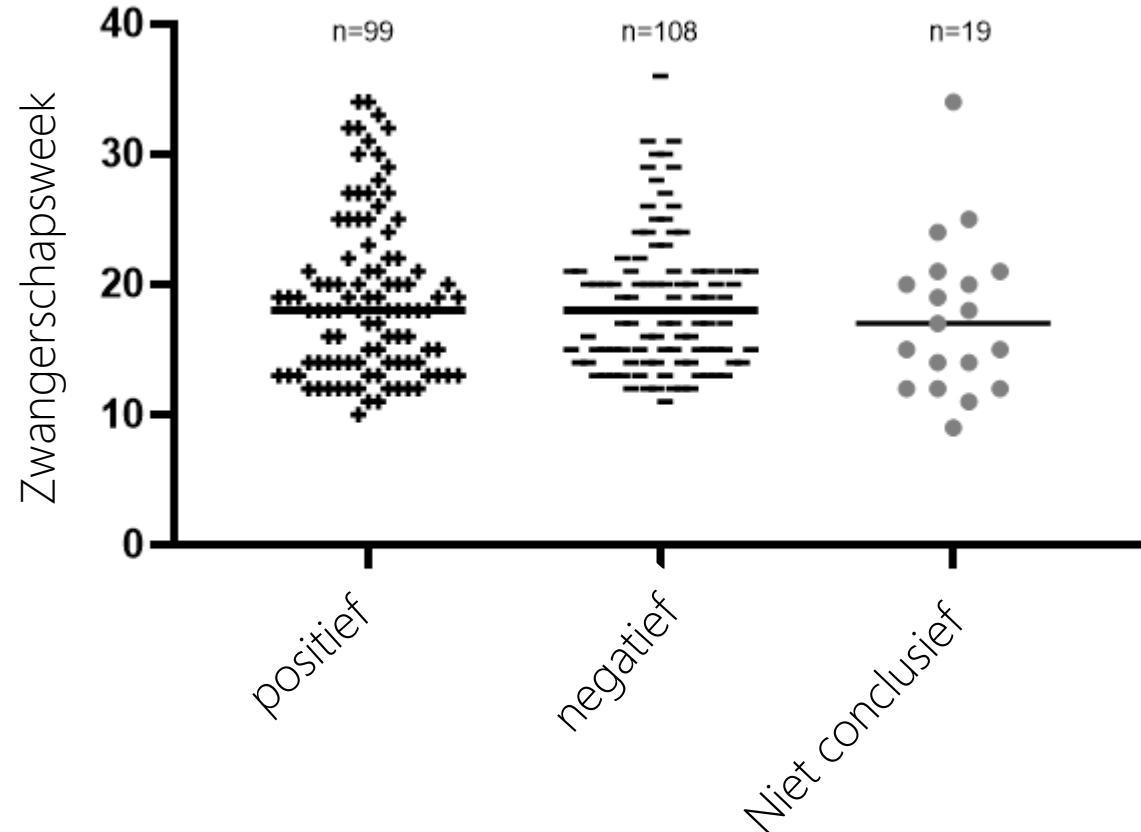


Verdeling zwangerschapsduur: gemiddeld rond 18 wkn





Niet conclusieve samples in eerste test: niet afhankelijk van zwangerschapsduur



In 10% van de testen mRASSF1a PCR negatief
 Controle foetaal DNA ook met Y-chromosoom PCR



Conclusies:

1. De nieuwe methode voor foetale bloedgroepantigeentypering met ddPCR voldoet in de praktijk voor een foetale bloedgroeptypering voor Rhc, C, D, E, K, HPA-1a of HPA-5b. NB: terugkoppeling typering gewenst!
2. Universele foetale (m)RASSF1a controle tezamen met Y-chromosoommerkers ter voorkoming fout-negatieve uitslagen.
3. Bij ongeveer 4% inzendingen: nieuw sample bij latere termijn
NB: voorheen bij 3% van de inzendingen geen conclusief resultaat door ontbreken controle!



Dank aan:

Camilla Calandrini

Erik van Beers

Onno J.H.M. Verhagen

Ellen van der Schoot

Ahmed Tissoudali

Barbera Veldhuisen,

Jessica Vessies

Mark Brussee

