

BioArray Molecular Immunohaematology

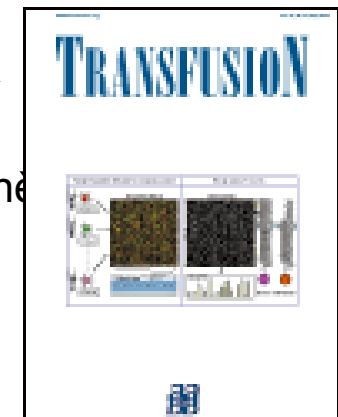
Graham Smallridge, Immucor
Prague November 2013





BIOARRAY SOLUTIONS
AN IMMUCOR COMPANY

- BioArray Solutions Ltd. Bylo založeno ve městě Warren, New Jersey, (USA) v roce 1997 skupinou vědeckých výzkumníků – pracujících na multiplexní DNA metodě založené na mikroploše kuliček, která by mohla určovat mnoho SNPs v jediném testu
- Započala spolupráce mezi firmou BioArray a krevní bankou New York Blood Center (NYBC)
 - Dr. Marion Reid si uvědomila potenciál této technologie pro typování krevních skupinových antigenů
 - V roce 2005 byl princip testu publikován v časopise Transfusion
 - V roce 2007 publikovali výsledky > 2,355 dárců na 24 antigenů



A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing

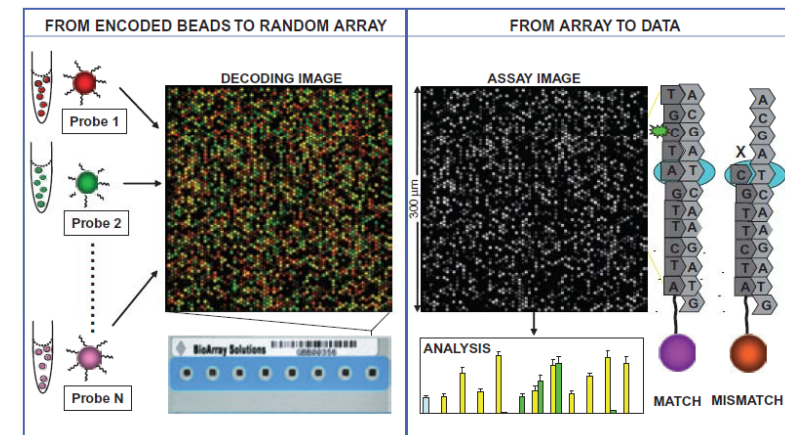
Ghazala Hashmi, Tasmia Shariff, Michael Seul, Prabhakar Vissavajhala, Kim Hue-Roye, Dalisay Charles-Pierre, Christine Lomas-Francis, Asok Chaudhuri, and Marion E. Reid

680 TRANSFUSION Volume 45, May 2005

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

736 TRANSFUSION Volume 47, April 2007



3 hlavní komponenty systému BioArray

BioArray BeadChip Soupravy



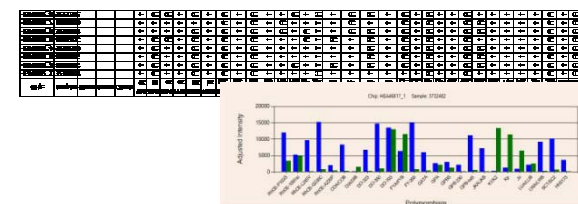
- 4 různé profily testů: HEA, HPA, RhD, RhCE
- Obsahují všechny potřebné reagenty od extrakce DNA až po konečný výsledek
- Dostupné ve formátu 8-čipových stripů nebo 96-čipových desek
- Poskytují výsledky ve stejný den s vysokým výkonem

Array Imaging System (AIS)

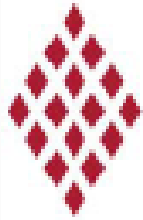


- Plně automatizovaný systém pro digitální zpracování obrazu
- Snímá a generuje obraz BeadChip testu
- Analyzuje a dekoduje obraz BeadChip testu

BioArray Solutions Information Service (BASIS)



- Program určený k zpracování a manipulaci s výsledky BeadChip testů
- Podporuje všechny BeadChip aplikace
- Přenáší informace, analyzuje data a generuje reporty
- Může být propojen přímo s LIS nebo pomocí SW prostředníka, jako např. Immucor ImmuLink



BioARRAY SOLUTIONS

AN IMMUCOR COMPANY

- Společnost Immucor Inc. rozpoznala důležitost role DNA typování pro určování krevních skupin
- BioArray Solutions komercializovali svůj systém jen jako test pro „výzkumné účely“ (‘Research Use Only’) a v US jej úspěšně zavedli v několika krevních bankách
- Společnost BioArray Solutions se stala součástí firmy Immucor v roce 2008
- Firma Immucor investovala do zdokonalení výrobků BioArray a převedla je z kategorie ‘Research’ do kategorie standardu IVD MD ‘In-vitro Diagnostic Medical Device’

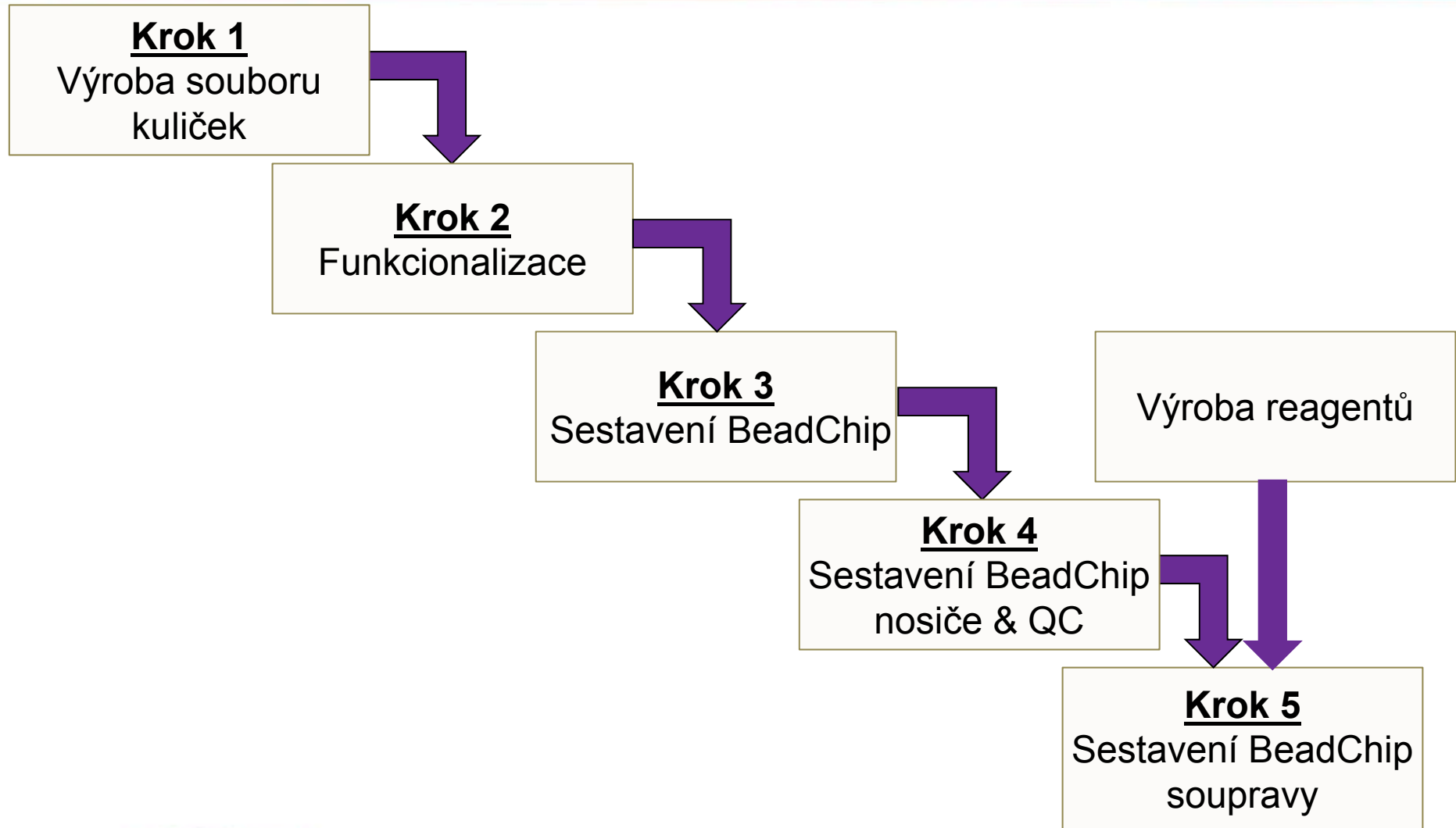
Výroba BeadChip testů

Přehled výroby BioArray BeadChip testů

- BioArray's BeadChips jsou vyráběny ve speciálním výrobním závodě ve městě Warren, NJ, USA
- Výrobní proces je řízen v rámci BioArray EN13485 certifikovaným systémem managementu kvality
- Systém řízení jakosti BioArrayis je certifikován podle standardů pro in-vitro diagnostické zdravotnické prostředky podle Přílohy IV IVDD (quality system approval certificate number 4000290/A)
- Řízení jakosti zahrnuje jak vstupní materiály, komponenty, výrobu, testovací zařízení, tak i finální produkt



Výroba souprav BeadChip v BioArray je proces o 5 krocích

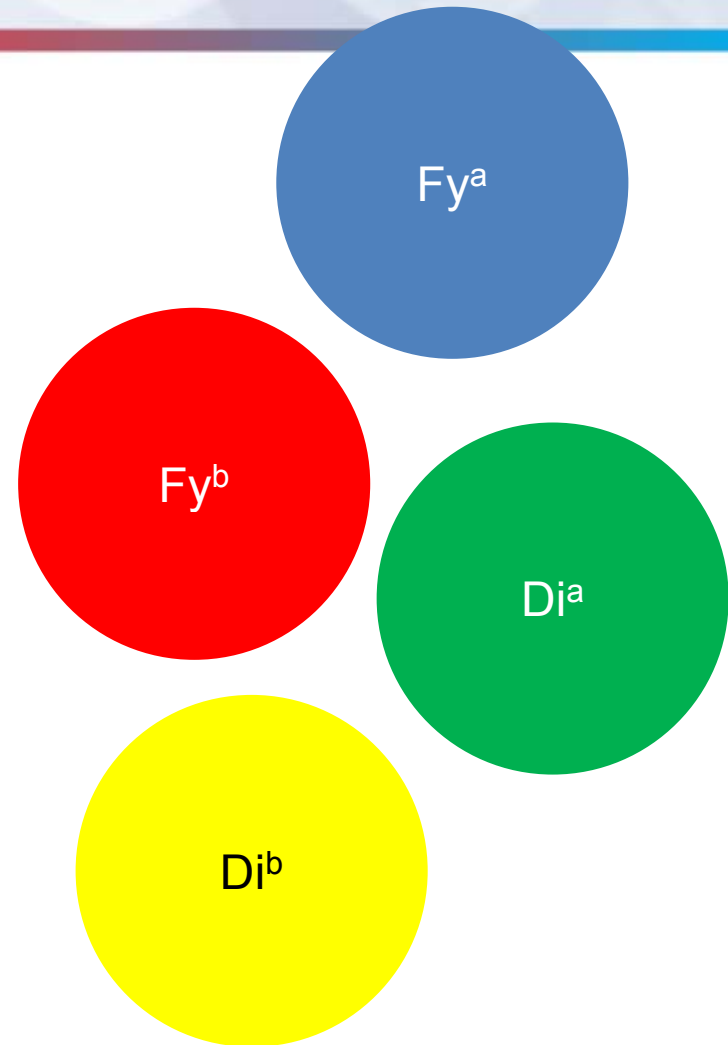
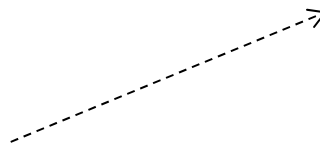
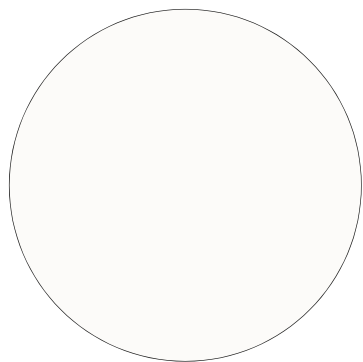


Krok 1
Výroba souboru kuliček

Metoda je založena na syntetických kuličkách, které mají průměr přibližně 3 mikrometry

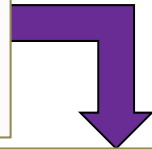
Kuličky jsou obarveny unikátní barvou.

Každá barva odpovídá jednotlivé alele v metodě



Výroba souprav BeadChip v BioArray je proces o 5 krocích

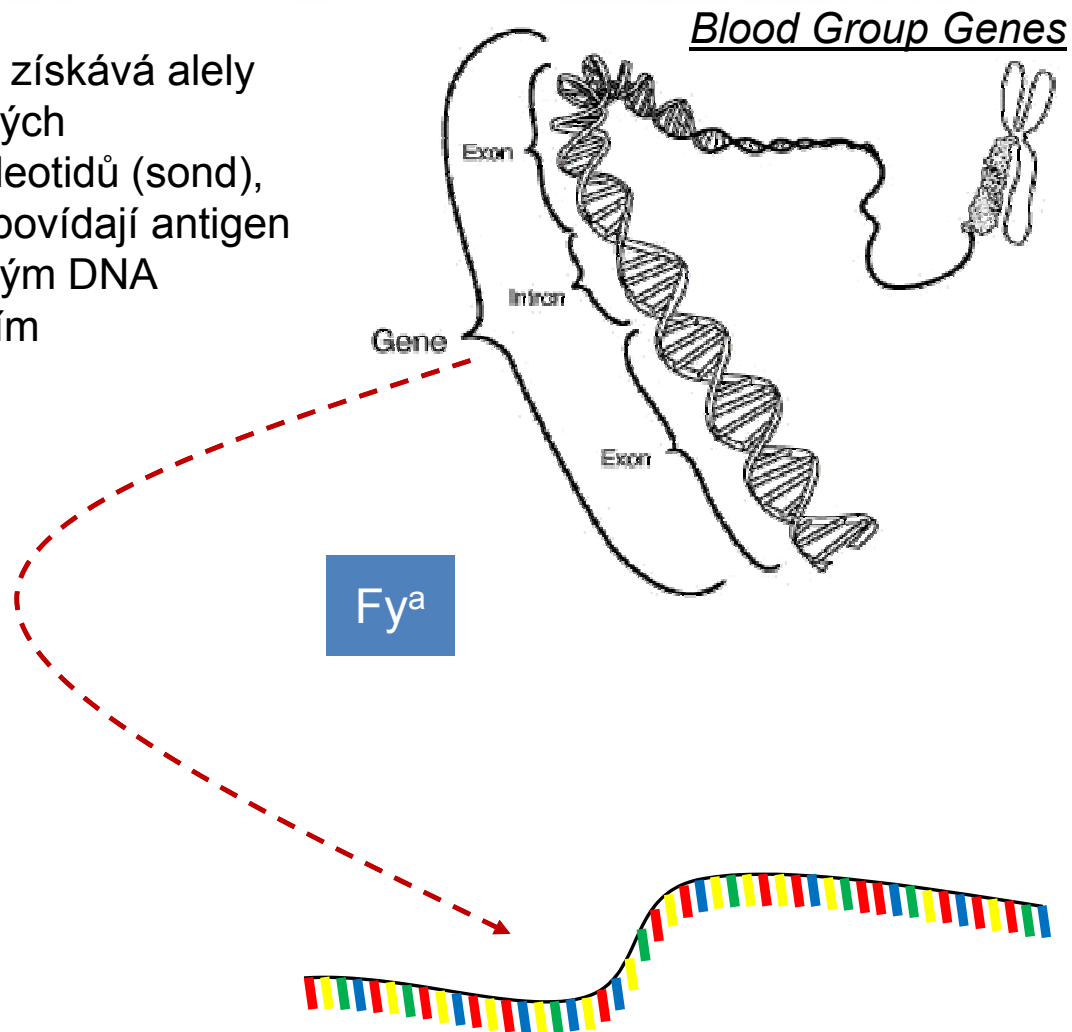
Krok 1
Výroba souboru
kuliček



Krok 2
Funkcionalizace

Krok 2
Funkcionalizace

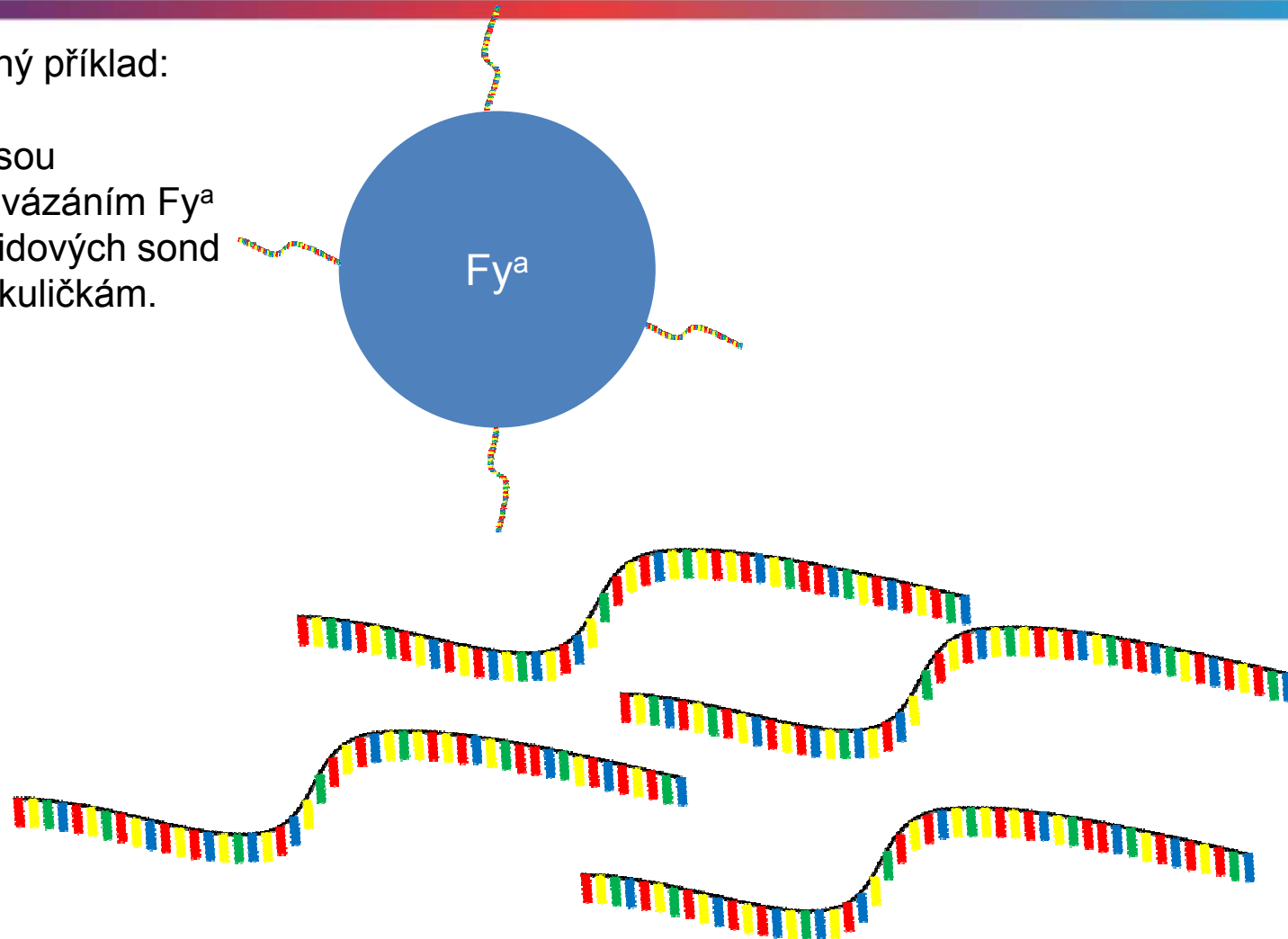
BioArray získává alely specifických oligonukleotidů (sond), které odpovídají antigen specifickým DNA sekvencím



Krok 2
Funkcionalizace

Zjednodušený příklad:

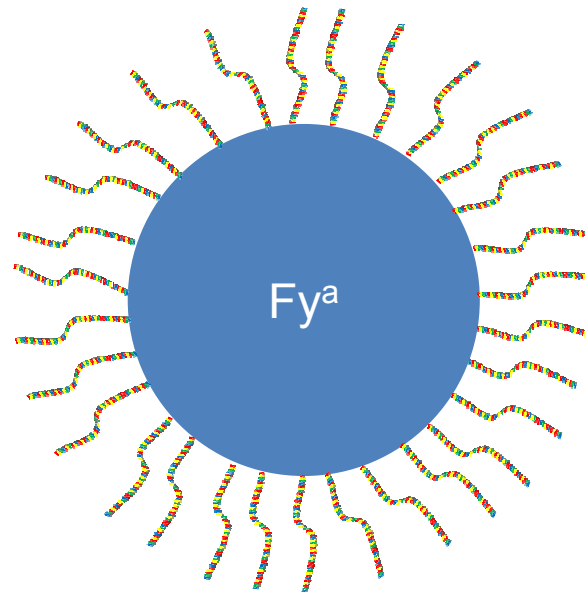
Fy^a kuličky jsou
vyrobeny navázáním Fy^a
oligonukleotidových sond
k “modrým” kuličkám.



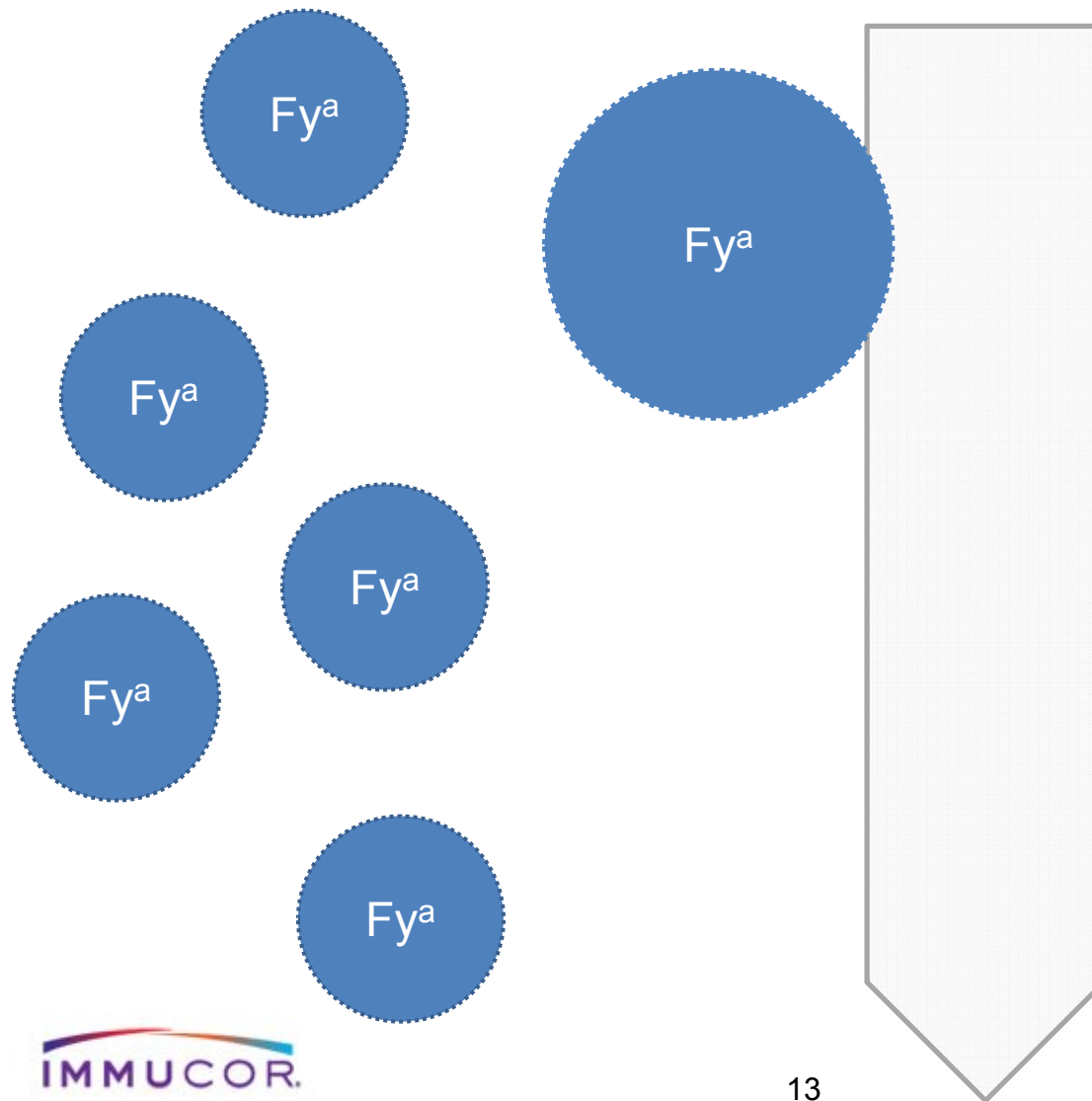
Krok 2
Funkcionalizace

Sondy rovnoměrně
pokrývají veškerý povrch
kuliček.

Každá kulička nese více
než 1 milión kopií sondy

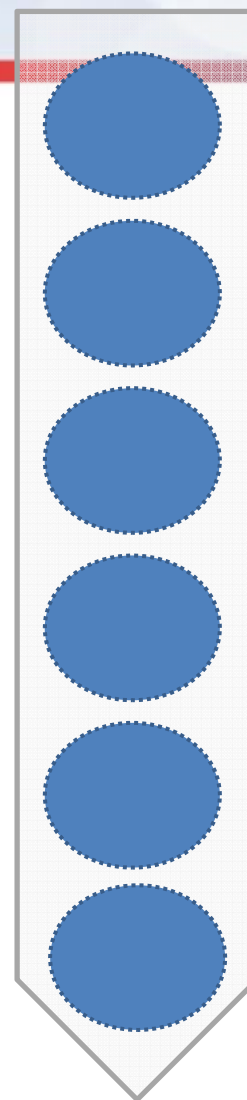
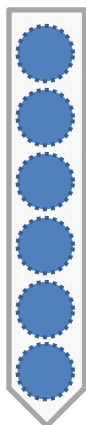


Krok 2
Funkcionalizace



Tisíce “modrých” Fy^a
kuliček jsou pokryty
odpovídajícími Fy^a
sondami.

Krok 2
Funkcionalizace



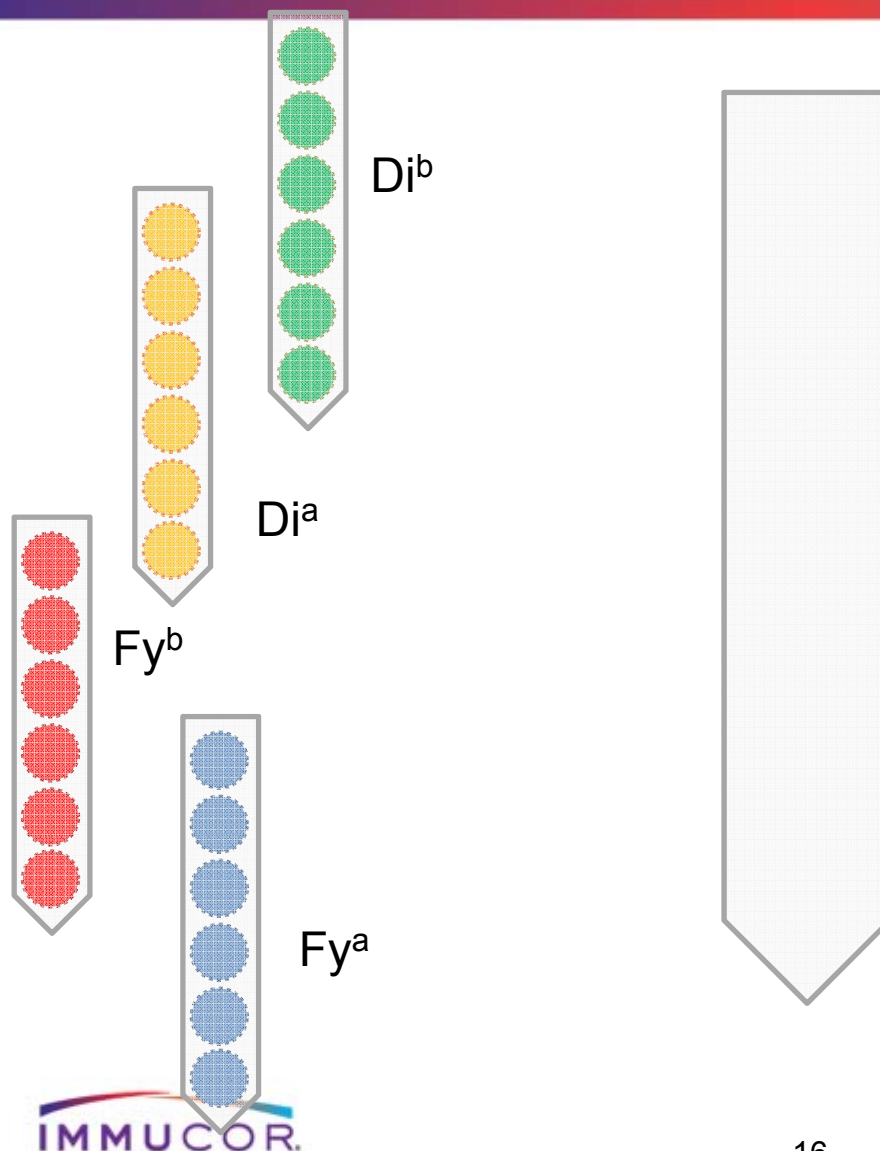
Výroba souprav BeadChip v BioArray je proces o 5 krocích

Krok 1
Výroba souboru
kuliček

Krok 2
Funkcionalizace

Krok 3
Sestavení BeadChip
testu

Krok 3
Sestavení



Zpracování kuliček je opakováno pro všechny alely testu

Každá alela je reprezentována vlastní jedinečně obarvenou kuličkou.

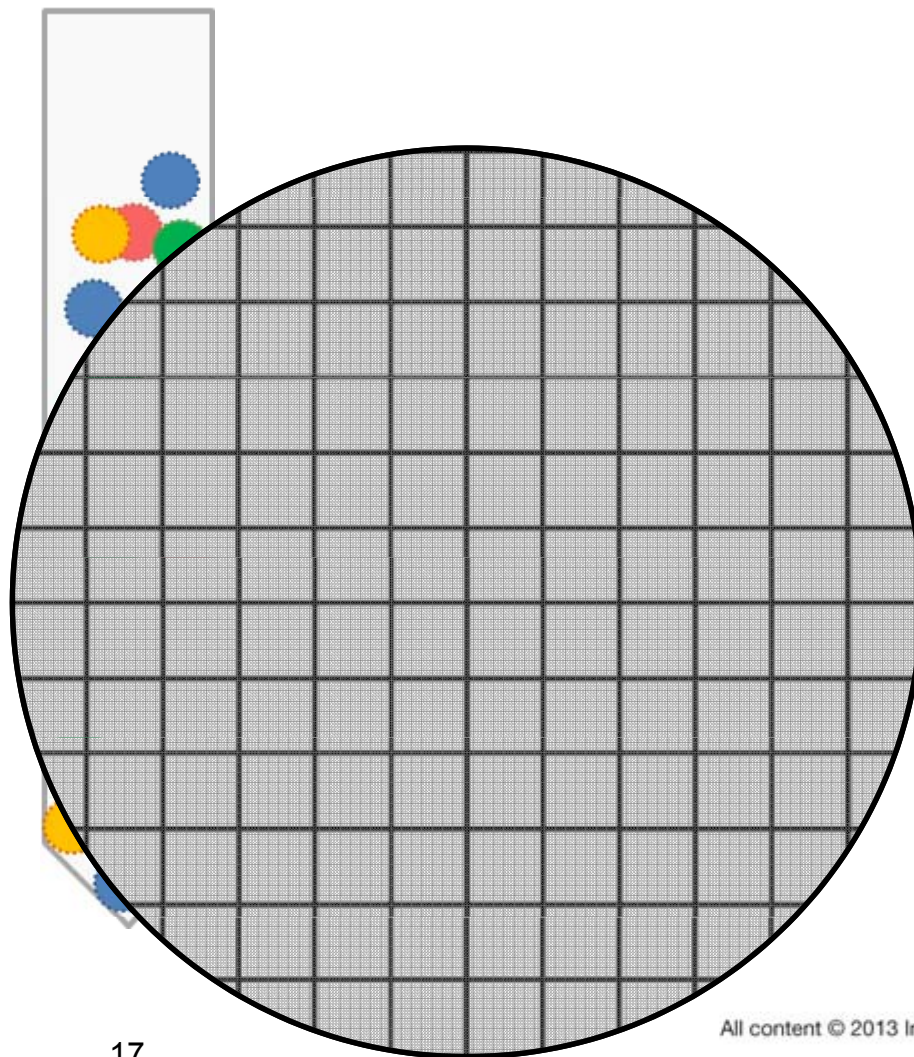
V tomto případě modrá odpovídá Fy^a , červená Fy^b , žlutá D_i^a a zelená D_i^b .

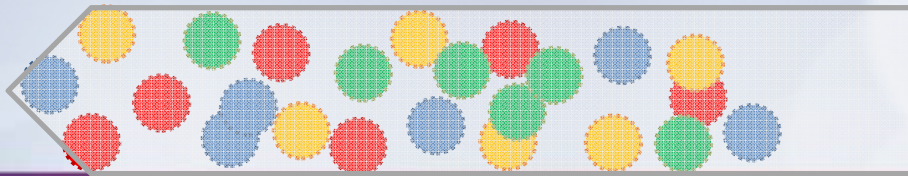
Dokončené kuličky jsou všechny smíchány dohromady

Krok 3
Sestavení




IMMUCOR.



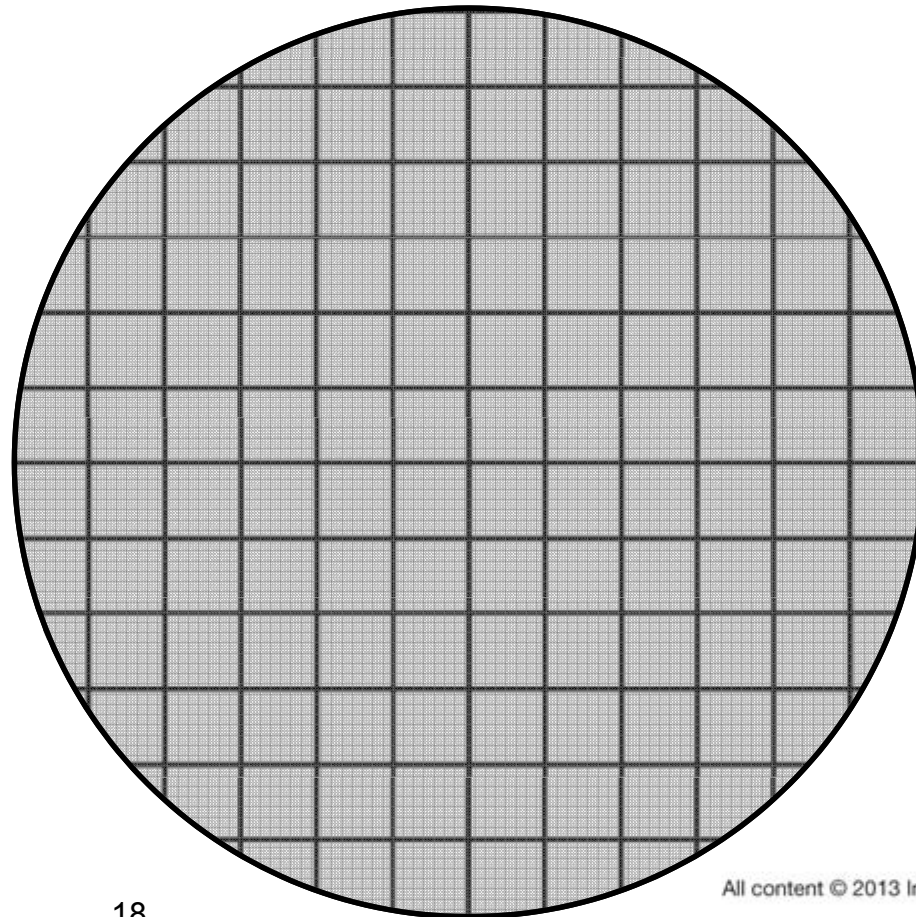


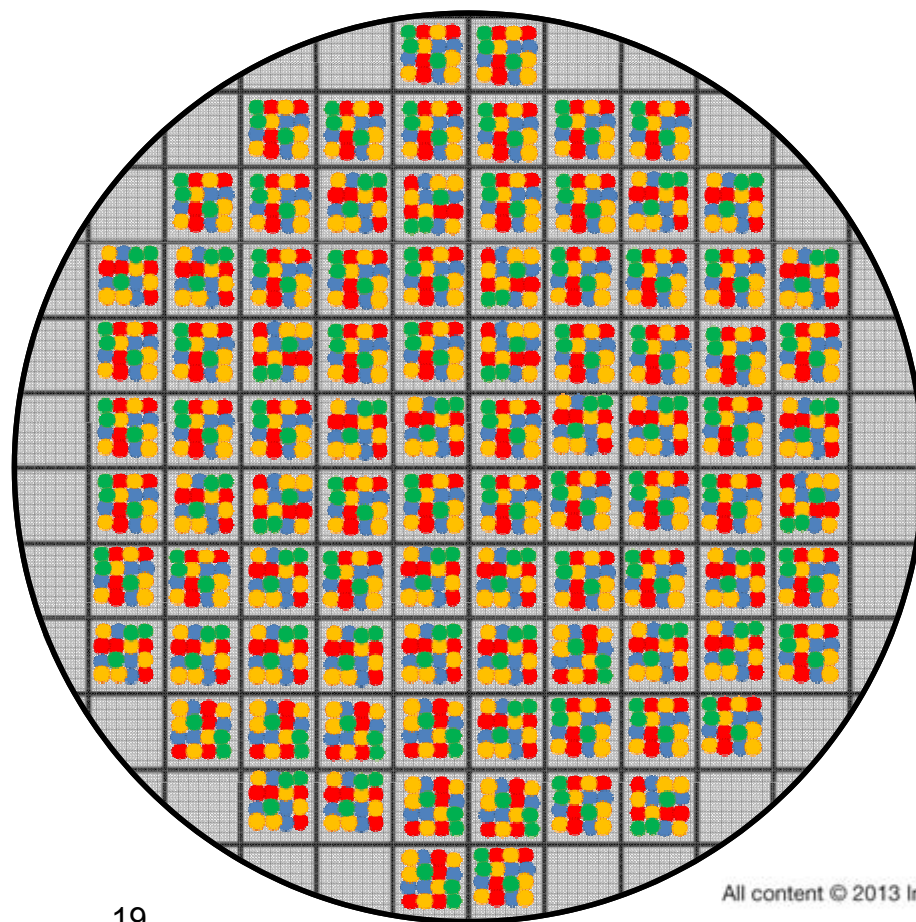
Krok 3 Sestavení

Poolované kuličky jsou náhodně rozptýleny na vyrobený křemíkový plátek

Kuličky jsou navázány na povrch vyrobeného plátku.

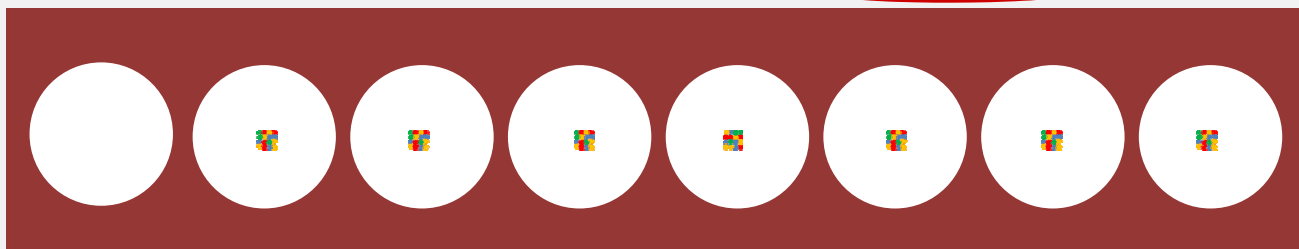
Každý čip o rozměrech $300\mu\text{m} \times 300\mu\text{m}$ obsahuje 4000+ náhodně rozptýlených kuliček.







BioArray Solutions

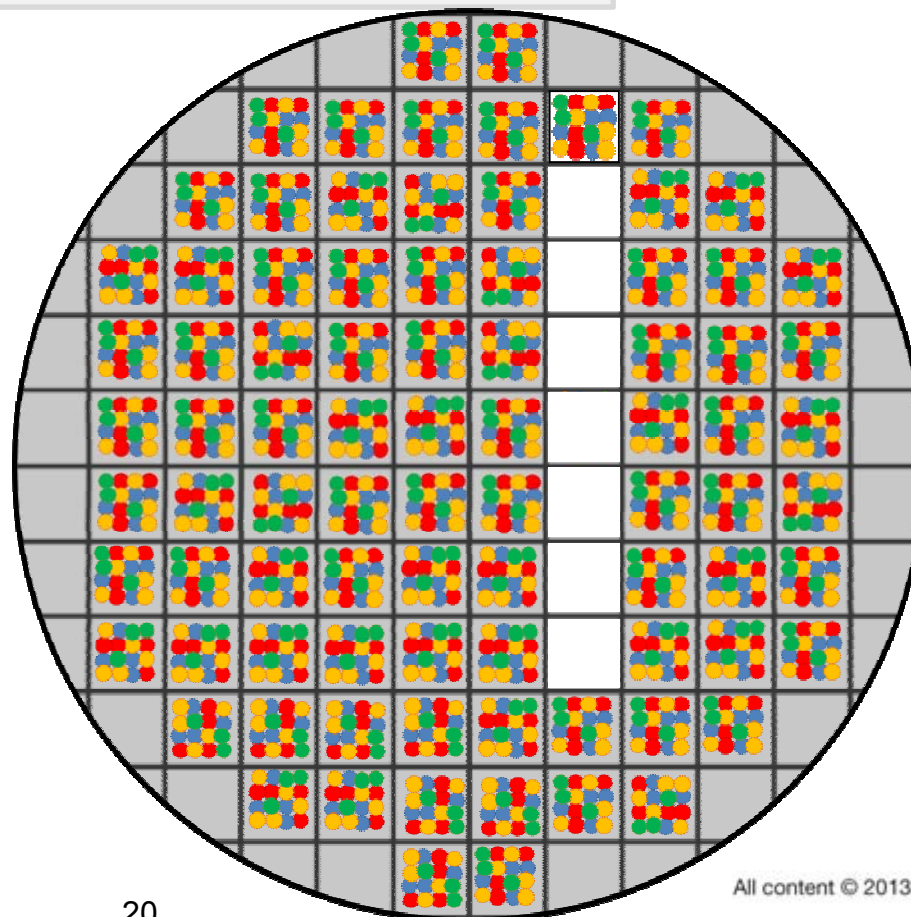


Krok 3
Sestavení

Každý křemíkový plátek je
rozřezán na jednotlivé
BeadChip testy

Každý jednotlivý BeadChip test
je pak nalepen na 8-čipový
nebo 96-čipový skleněný nosič.

Každý BeadChip nosič je také
unikátně identifikován čárovým
kódem.



Výroba souprav BeadChip v BioArray je proces o 5 krocích

Krok 1
Výroba souboru
kuliček

Krok 2
Funkcionalizace

Krok 3
Sestavení BeadChip
testu

Krok 4
Sestavení BeadChip
nosiče & QC

Krok 4 Kontrola kvality

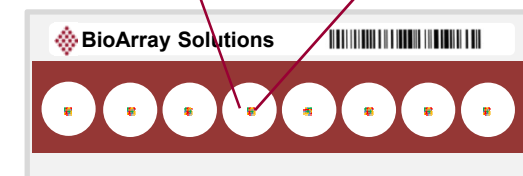
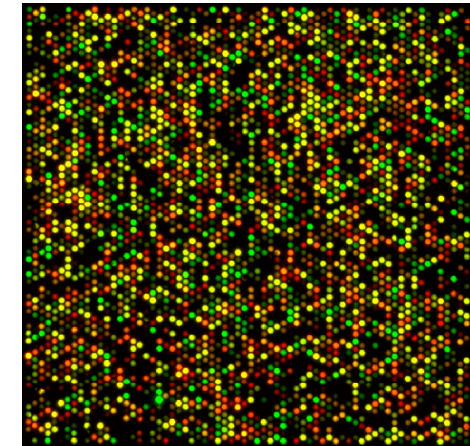
V konečném stadiu výroby je použit přístroj (pracující na principu mikroskopu) k sejmutí barevného obrazu každého políčka BeadChip.

Tento barevný obrázek je analyzován a je tak určen každý typ kuličky (podle její barvy) v každé z 4,000 pozic v jednotlivém políčku.

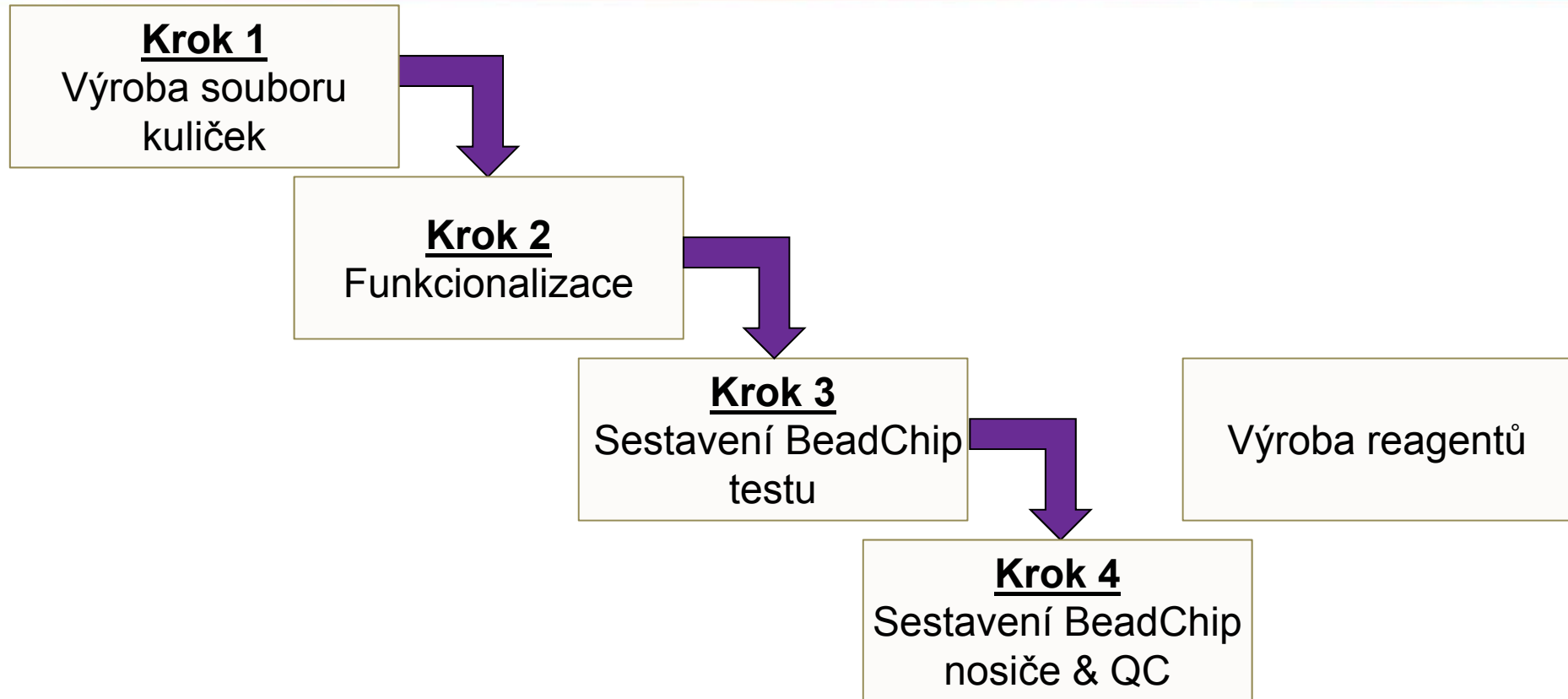
Tato data jsou analyzována a srovnána s danými kritérii kvality včetně minimálního počtu každého typu kuličky a „četnosti výskytu kuliček“. Každý nosič, který obsahuje nevyhovující BeadChip, je vyřazen.

Tato informace o ‘mapě kuliček’ je uložena jako ‘dekódovací soubor’ pro každý čip. Tyto dekódovací soubory jsou pak uloženy na CD dodávaném s každou soupravou.

>4,000 ENCODED BEADS



Výroba souprav BeadChip v BioArray je proces o 5 krocích



Krok 5

Výroba diagnostik

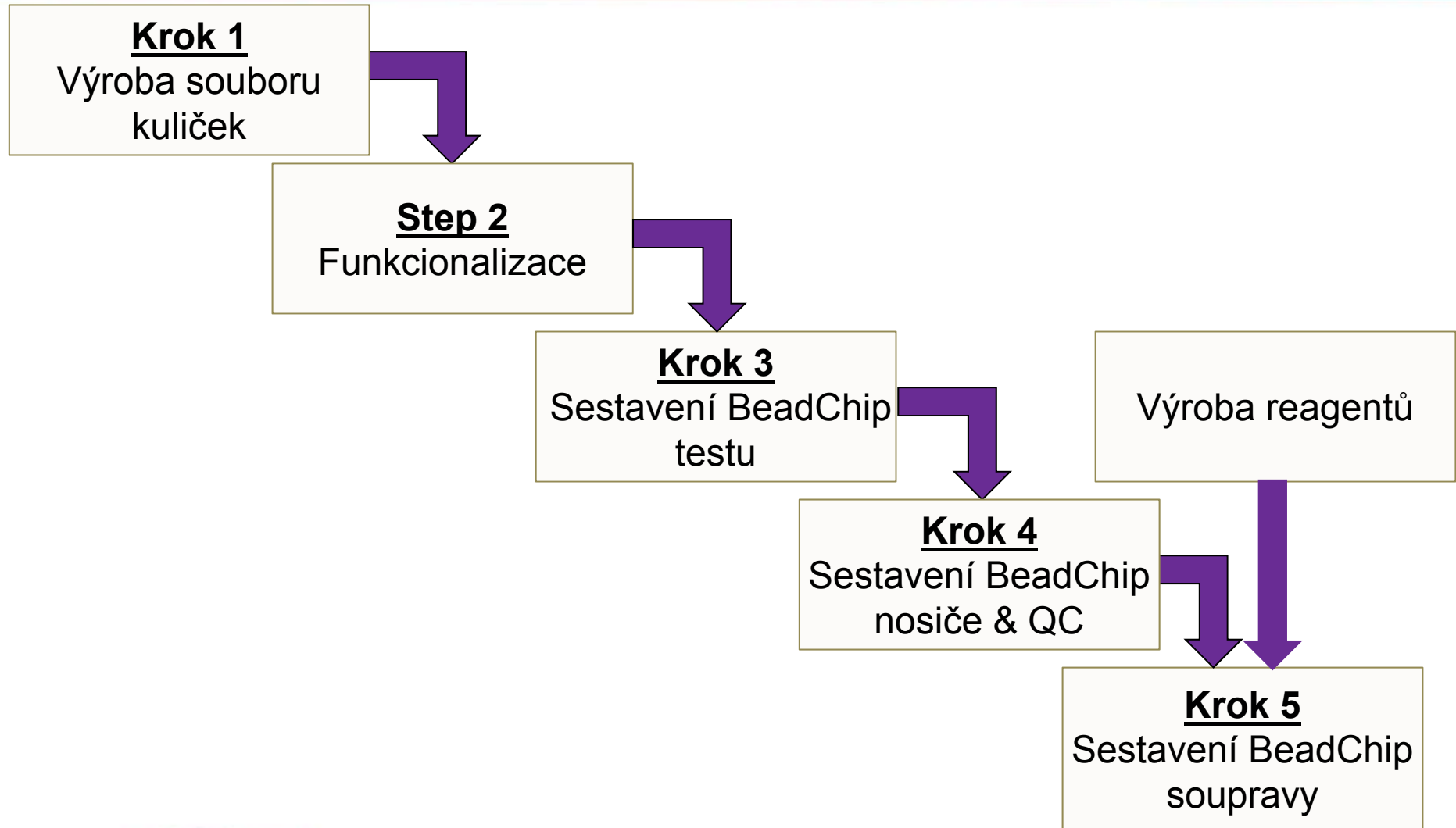
Vedle BeadChip nosičů BioArray soupravy obsahují diagnostika potřebná k provedení testu

- PCR směs (Oligonukleotidové primery, dNTPs v pufru)
- HotStarTaq™ polymerase¹
- Clean-up Reagent
- Lambda exonukleáza
- eMAP elongační směs (dNTPs, fluorescently labelled dNTPs, DNA polymerase)



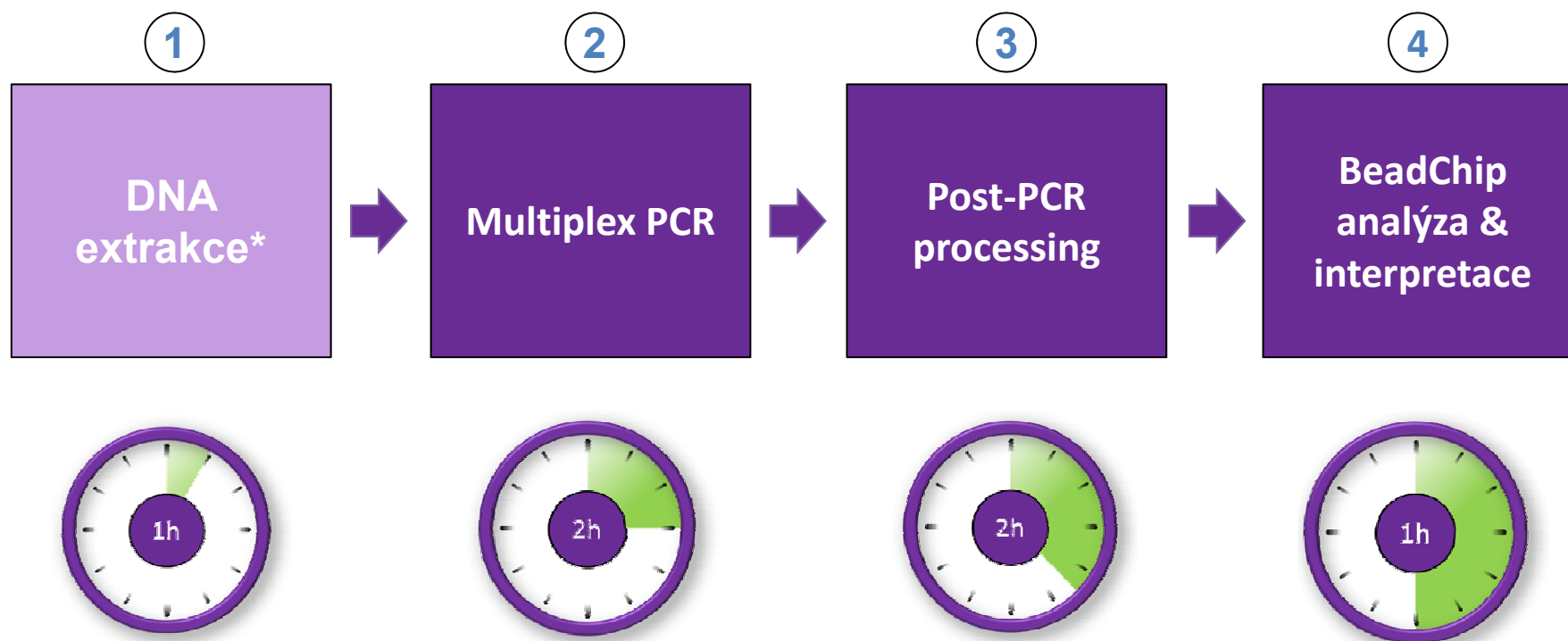
(1) HotStarTaq is a trademark of F. Hoffman-La Roche Ltd.

Výroba souprav BeadChip v BioArray je proces o 5 krocích



Provedení BeadChip testů

Provedení eMAP BeadChip testu zahrnuje čtyři hlavní operace



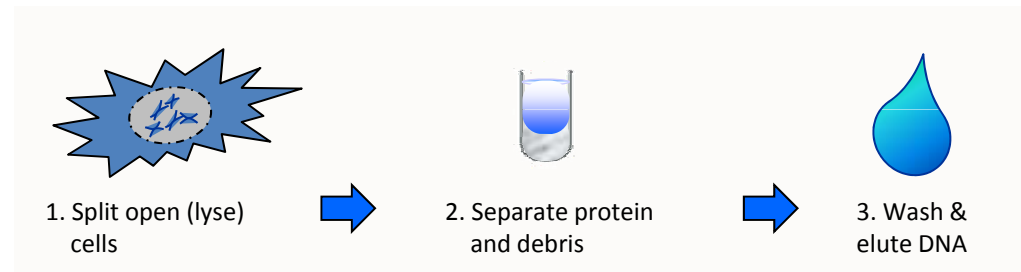
*Čas od započetí
testu*

*vyžadováno jako vstup BeadChip testů. Čas provedení může být rozdílný.

- DNA může být extrahována ze vzorku plné krve (typicky ~200mL)
- Laboratoře mohou již mít zavedený systém postupů pro izolaci DNA, které mohou být vyhovující pro BioArray metody

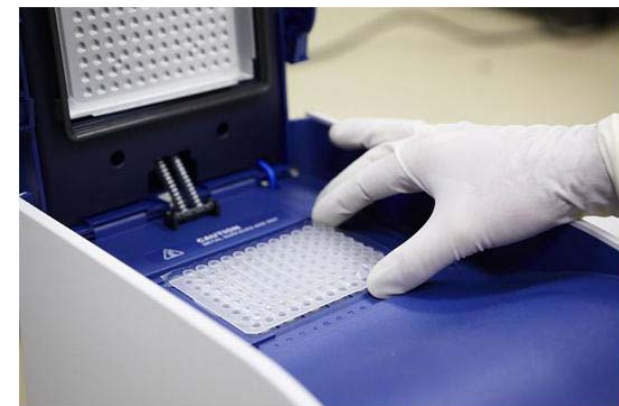
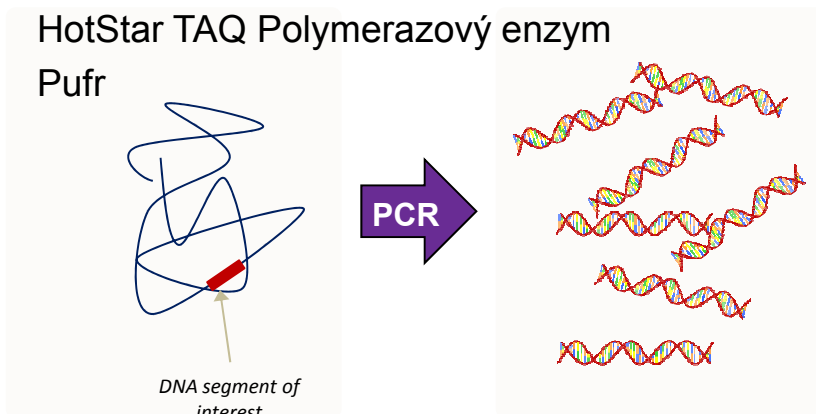
“Pro optimální PCR amplifikaci je vyžadována minimální koncentrace extrahované DNA 10 ng/ μ L”

- Jsou dostupné mnohé DNA extrakční produkty
 - Extrakční technologie zahrnující křemíkové sloupce a magnetické kuličky
 - Vysoce výkonné, automatizované metody mohou zpracovat vícenásobné vzorky současně v čase několika hodin



Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR)

- BioArray BeadChip metody používají multiplexní PCR – několikanásobné cílové sekvence jsou amplifikovány ve stejném čase
- PCR proces amplifikuje cílovou oblast DNA, která obsahuje požadovaný polymorfismus (SNPs)
 - Jsou syntetizovány miliony kopií cílové DNA (amplikony)
- Komponenty PCR zahrnují:
 - oligonukleotidové primery (odpovídající DNA sekvencím) pro identifikaci cílových oblastí
 - dNTPs (DNA stavební nukleotidy)
 - HotStar TAQ Polymerazový enzym
 - Pufr

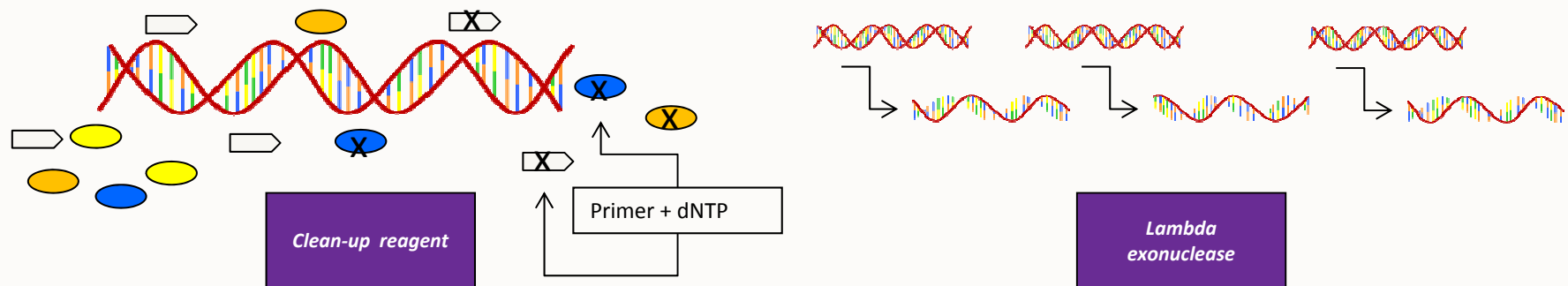


Post PCR Processing

- Po provedení multiplexních PCR činností je použit Clean-up Reagent pro odstranění zbytkových primerů a dNTP v amplifikovaném produktu
- Lambda Exonukleáza je následně použita pro vytvoření jednovláknové DNA (ssDNA) selektivní destrukcí jednoho vlákna DNA vyčištěného produktu

Process

1. Inkubace (37 °C) → 2. Inaktivace (80 °C) → 3. Inkubace (37 °C) → 4. Inaktivace (80 °C)



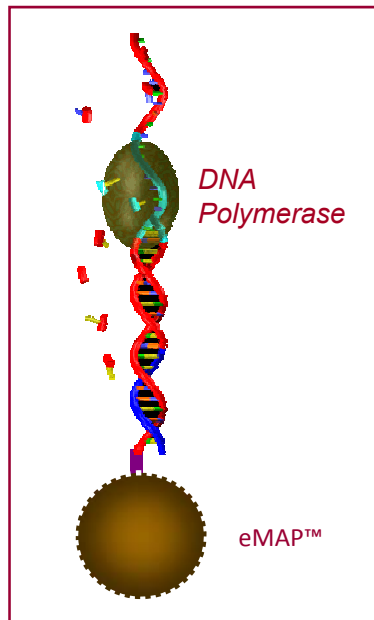
BeadChip analýza (I)

- Jednovláknové DNA amplikony jsou smíchány s Elongačním Reagentem (fluorescenčně značené nukleotidy a DNA polymeráza)
- Přenesené na BeadChip a inkubovány



- Během inkubace jsou DNA amplikony navázány na odpovídající DNA sekvence sond příslušných kuliček

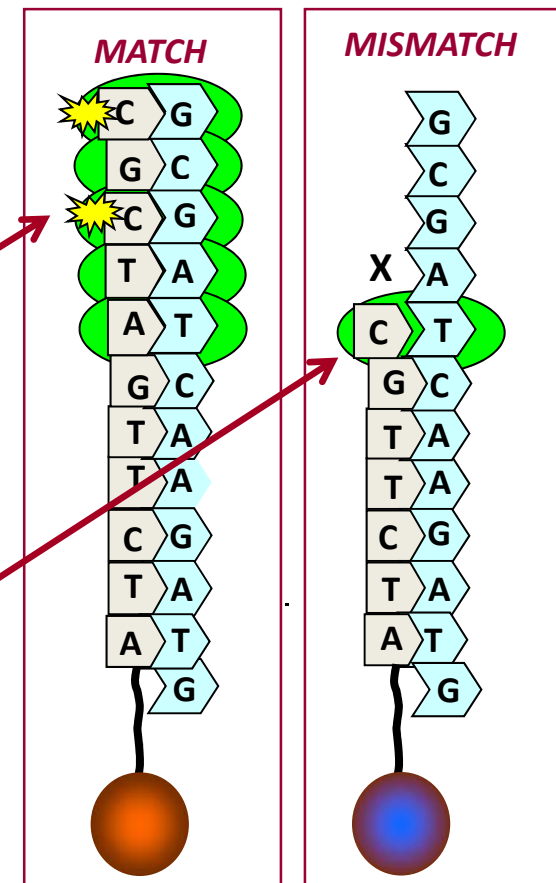
BeadChip analýza (II)



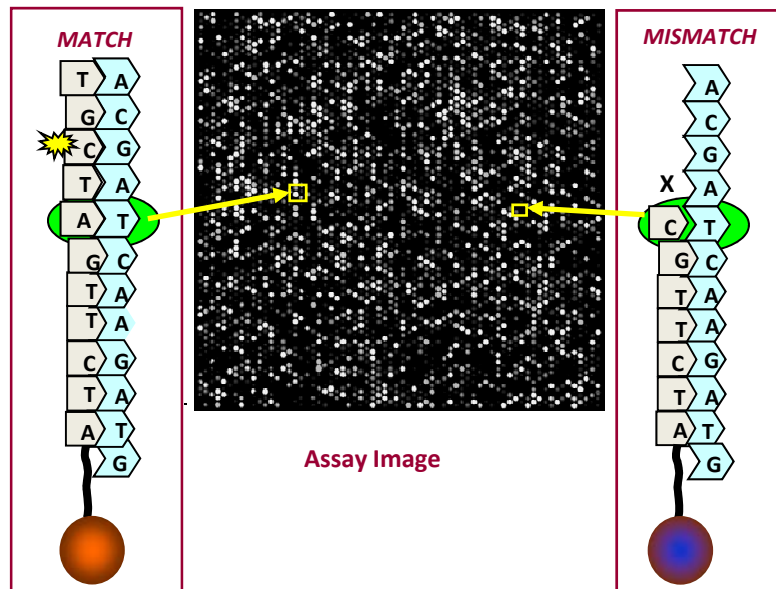
- Pokud sekvence amplifikované DNA přesně odpovídá 3' koncové bázi, sonda je prodloužena při současném zakomponování fluorescentních značek

- Pokud amplifikovaná DNA neodpovídá přesně sondě, DNA sonda není prodloužena, takže fluorescentní značky nejsou navázány

Rozlišení pomocí ALELE-SPECIFICKÝCH prodloužení

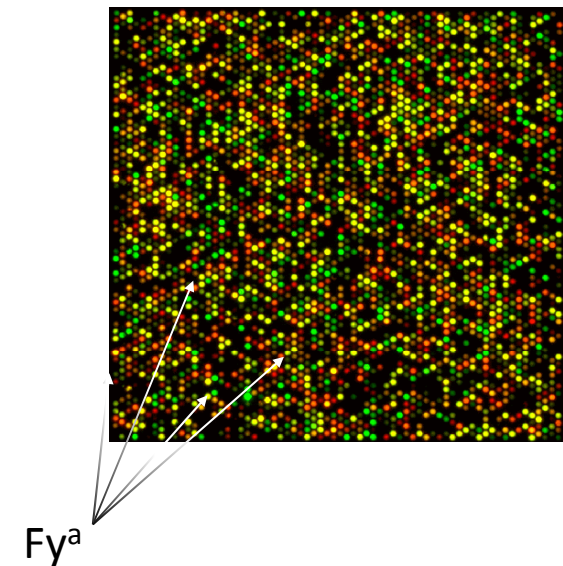


BeadChip analýza (III)



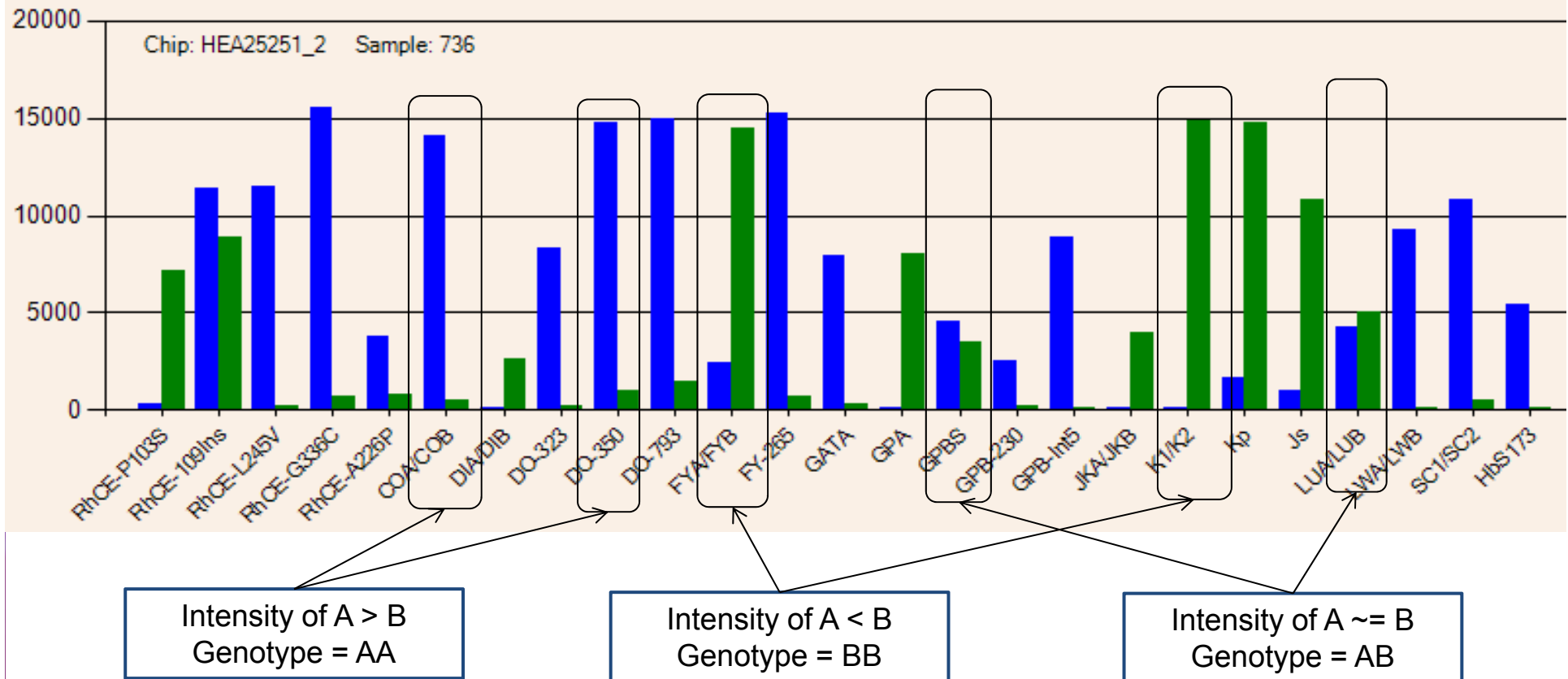
- Array Imaging System (AIS400) zachytí obraz čipu s fluorescenčními (pozitivní) a nefluorescentními (negativní) kuličkami
- Obraz testu je převeden na data o intenzitě pro další analýzu

- BASIS (BioArray Information System) sloučí hodnoty analýzy obrazu s dekodovací informací (mapa kuliček) pro výpočet fluorescentní intenzity pro každý odpovídající krevně skupinový gen.
 - Více než 4000 kuliček je na každém políčku BeadChip



4

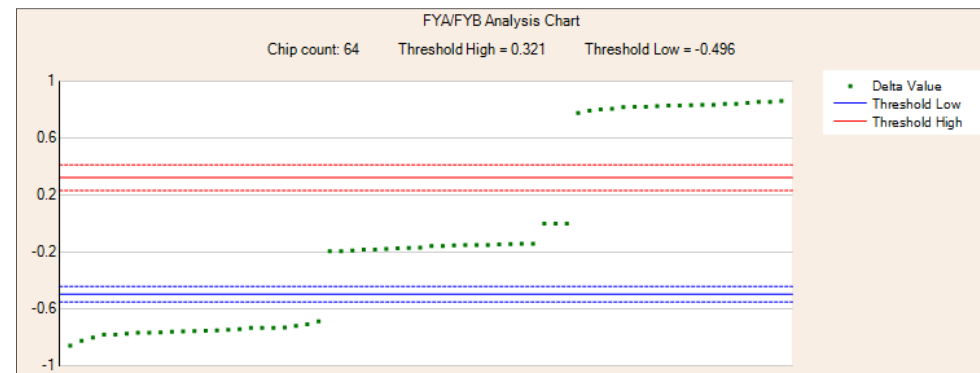
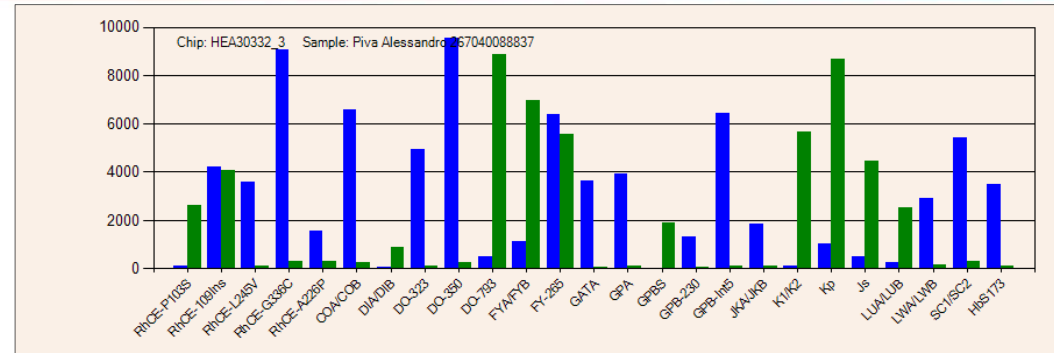
BeadChip interpretace



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

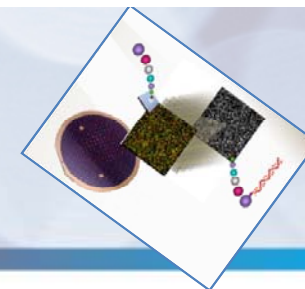
BeadChip interpretace

- Data jsou analyzována, výsledky interpretovány a reportovány pomocí programu BASIS



Chip	Sample	Notes	Status	Detail	RH2 C	RH3 E	RH4 c	RH5 e	KEL1 K	KEL2 k	KEL3 Kp ^a	KEL4 Kp ^b	KEL6 Js ^a	KEL7 Js ^b	FY1 Fy ^a	FY2 Fy ^b	JK1 Jk ^a	JK2 Jk ^b	MNS1 M	MNS2 N	MNS3 S	MNS4 s	LU1 Lu ^a	LU2 Lu ^b	DI1 Di ^a	DI2 Di ^b	CO1 Co ^a	CO2 Co ^b	DO1 Do ^a	DO2 Do ^b	DO4 Hy	DO5 Jo ^a	LW5 Lw ^a	LW7 Lw ^b	SC1 Sc1	SC2 Sc2	- HbS			
HEA46817_1	3732482				+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0		
HEA46817_2	3731512				+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0
HEA46817_3	3732139				+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0	
HEA46817_4	3732538				+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0	
HEA46817_5	3731910				+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0	
HEA46817_6	3732222				+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0	
HEA46817_7	3732325				+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0
HEA46817_8	3731096				+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0	

BeadChip soupravy



HEA BeadChip™ analyzuje 17 polymorfismů spojených s 11 krevně skupinovými systémy

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

HPA BeadChip™ analyzuje 11 PLT glykoproteinových polymorfismů

Antigens
HPA-1(a/b)
HPA-2(a/b)
HPA-3(a/b)
HPA-4(a/b)
HPA-5(a/b)
HPA-6(a/b)
HPA-7(a/b)
HPA-8(a/b)
HPA-9(a/b)
HPA-11(a/b)
HPA-15(a/b)

RhD a RhCE BeadChip soupravy jsou určeny pro zkoumání předpokládaných Rh variantních antigenů

Aplikace v transfuzním lékařství

Literatura a konference prezentují mnoho aplikací typování antigenů, kde je použito genotypizace, včetně:

✓ ✓ ✓ 1. Dárci “rozšířené typování”

✓ ✓ ✓ 2. Poly- nebo v poslední době transfundovaní pacienti

✓ ✓ ✓ 3. Pacienti s AIHA

✓ ✓ ✓ 4. Pacienti s pozitivním PAT

✓ ✓ ✓ 5. Pacienti s Thalasemií

✓ ✓ ✓ 6. Pacienti se srpkovitou anémií (SCD)

BioArray HEA BeadChip

✓ 7. Určení RhD zygoty

✓ 8. Určení RhD a antigenů plodu z fetálních DNA fragmentů v plasmě matky

✓ 9. Typování RhD variant (variantní nebo slabé D)

RhD BeadChip

✓ 10. Řešení ABO diskrepancí

✓ 11. Typování trombocytárních antigenů

BioArray HPA BeadChip

✓ 12. Typování diagnostických erytrocytů

BioArray HEA BeadChip



BIOARRAY SOLUTIONS

AN IMMUCOR COMPANY

- BioArray's systems a jejich produkty byly nezávisle certifikovány v souladu s evropskými IVDD IVDD požadavky
- HEA soupravy jsou certifikovány jako ZP List A – ekvivalentní serologickým diagnostikům jako např. Anti-C, Anti-Kell atd.



- Do současné doby bylo provedeno více než 650,000 BeadChip testů
– To je přibližně 20 milionů určení antigenů