



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ



Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

ΘΡΟΜΒΩΣΗ – ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΑ – ΙΑΤΡΙΚΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΤΤΙΣΕΩΝ

Επιστημονική Υπεύθυνη: Ομότιμη Καθηγήτρια Δρ. Σ. Τραυλού

## Διπλωματική Εργασία

### «Μοριακός έλεγχος του ΑΒΟ συστήματος»

ΟΝΟΜΑ : Κουτσούρη Θεοδώρα

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ : Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Μαριάννα Πολίτου

Ακαδημαϊκό Έτος : 2012-2013

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ύστερα από την ανακάλυψη του συστήματος ABO, από τον Karl Landsteiner το 1901 ο Felix Bernstein το 1924 προέβλεψε ότι ο μηχανισμός κληρονομικότητάς του περιλαμβάνει 3 αλληλόμορφα που εδράζονται στο μακρό σκέλος του χρωμοσώματος 9(6-9), θέση 9q34.1. Δεν κωδικοποιούν για A και B αντιγόνα, αλλά για ένζυμα τρανσφεράσες που καταλύουν την προσθήκη μονοσακχαριτών σε ολιγοσακχαριδικές αλυσίδες. Οι υποομάδες των ABO διακρίνονται από μειωμένες ποσότητες των A, B ή O (H) αντιγόνων στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων. Οι υποομάδες A ταξινομούνται με βάση την ποσότητα των A αντιγόνων, και η ποσότητα του A αντιγόνου μειώνεται με τη σειρά  $A^1, A^2, A^3, A^x, A^m, A^{el}$ . Παρόμοια, οι υποομάδες της ομάδας αίματος B ταξινομούνται με βάση την ποσότητα του B αντιγόνου, που μειώνεται με τη σειρά  $B, B^3, B^x, B^m, B^{el}$ . Η ομάδα αίματος AB ταξινομείται σε εννιά υποομάδες ( $A^xB, A^1B^x, A^mB, A^1B^m, A^{el}B, A^1B^{el}, cisA^2B^3, cisA^2B, cisA^1B^3$ ) με βάση την ποσότητα των A και B αντιγόνων.

Οι Yamamoto, et al. κλωνοποίησαν και καθόρισαν τις δομές τους. Γονοτυπικά το  $O_1$  αλληλόμορφο διαφέρει από το  $A_1$  αλληλόμορφο κατά μία έλλειψη νουκλεοτιδικής βάσεις στη θέση 261. Δύο νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις διαχωρίζουν το  $A_1$  από το  $A_2$  αλληλόμορφο. Το  $A_1$  με το  $O_2$  αλληλόμορφο διαφέρουν μεταξύ τους σε 3 βάσεις, 2 από τις οποίες οδηγούν σε αντικατάσταση αμινοξέως. Τα  $A^{el}$  άτομα διαθέτουν ένα αλληλόμορφο με IVS6 + 5G-A μετάλλαξη και  $B^{el}$  άτομα να διαθέτουν ένα γονίδιο B με 502C-T μετάλλαξη. Μεταξύ του  $A_1$  και B υπάρχουν επτά 7 νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις.

Έκαναν γενετική ανάλυση των αντιγόνων του ABO συστήματος χρησιμοποιώντας τεχνικές μοριακής βιολογίας. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης-περιορισμένου μήκους θραύσματος πολυμορφισμού (PCR-RFLP, restriction fragment length polymorphism), η PCR-άμεσης αλληλούχισης (PCR-direct sequencing), η PCR- διαμόρφωση μονόκλωνου πολυμορφισμού (PCR-SSCP, single strand conformation polymorphism), η PCR- ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλομόρφων (PASA, PCR-amplification of specific alleles) ή ASPCR και πραγματικού χρόνου PCR μέσω ανάλυσης των καμπύλων τήξεως (real time PCR, melting curve analysis). Ως εκ τούτου, η μέθοδος PASA είναι ταχεία, απλή και χρήσιμη για την ανίχνευση του γονοτύπου των ABO και cisAB ομάδων αίματος σε σύγκριση με τις μεθόδους PCR-RFLP, PCR-direct sequencing και PCR-SSCP. Ενώ η τεχνική real-time PCR ιδιαίτερα χρήσιμη για τον προσδιορισμό στο αίμα των πιθανών  $A^{el}$  και  $B^{el}$  αλληλομόρφων.

Έτσι προτείνουμε ένα διάγραμμα ροής εργασιών για τον προσδιορισμό σπάνιων ομάδων αίματος. Πρώτον, μία ορολογική μέθοδος που θα χρησιμοποιείται για την ταχεία διαλογή ως προς την παρουσία του αντιγόνου και του αντισώματος ABO. Όταν ληφθεί ένα αποτέλεσμα όπου ο προσδιορισμός της ευθείας ομάδα αίματος είναι O και η ανάστροφη ομάδα αίματος δίνει A ή B, απομονώνουμε γονιδιωματικό DNA από το περιφερικό αίμα για να εφαρμόσουμε μία από τις τεχνικές PCR. Εν ολίγοις, η ταυτοποίηση των παραλλαγών του ABO γονιδίου που

σχετίζονται με υποομάδες ABO είναι μια σημαντική συμβολή σε κάθε μεμονωμένη περίπτωση και προσθέτει επίσης γνώση για την τρέχουσα κατανόηση των γενετικών παραγόντων που επηρεάζουν τις ομάδες αίματος.

Εν συνεχεία παρουσιάσαμε τις ορολογικές μεθόδους προσδιορισμού της ABO ομάδας αίματος όπως είναι πρώτον ο προσδιορισμός πάνω στην πλάκα εργασίας των ερυθροκυτταρικών αντιγόνων A και B (ευθεία) και ο προσδιορισμός των αντισωμάτων αντι-A και αντι-B που υπάρχουν στον ορό του ασθενούς (ανάστροφη). Δεύτερον ο προσδιορισμός της ομάδας αίματος της ευθύς και της ανάστροφης αντίδρασης σε σωληνάκια (*in vitro*). Τρίτον ο προσδιορισμός των αντιγόνων A, B και D με την μέθοδο μικροσωληναρίων γέλης.

Ο προσδιορισμός της ομάδας αίματος με βάση το DNA αποτελεί μια πολύτιμη συμπληρωματική και όχι εναλλακτική λύση στις παραδοσιακές μεθόδους προμεταγγισιακού ελέγχου διότι η μέθοδος με βάση το DNA δεν είναι εντελώς ισχυρή, λόγω των νέων μεταλλάξεων που προκύπτουν συνεχώς. Η Tandem εφαρμογή, της βασιζόμενης στο DNA μεθοδολογίας και οι υφιστάμενες μέθοδοι που αναλύουμε, θα παρέχουν σε μεγάλο βαθμό βελτιώσεις στην παροχή προσδιορισμένου ως προς την ομάδα αίματος και τον φαινότυπο αίματος, σε ασθενείς με αλλοαντισώματα. Για να παρακάμψουμε βέβαια αυτόν τον περιορισμό περιγράψαμε την μέθοδο αλληλούχησης επόμενης γενιάς (NGS, next-generation sequencing) για την γονοτύπηση των γονιδίων των ομάδων αίματος. Το κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι παρέχει μια σφαιρική άποψη της ποικιλίας των αλληλόμορφων που υπάρχουν σε πολλαπλά γονίδια χωρίς να έχει σημασία η εθνικότητα ή οι πολυμορφισμοί, ενώ άλλα εργαλεία υψηλής απόδοσης στοχεύουν μόνο σε αρκετά SNP την ίδια στιγμή. Το αμέσως επόμενο βήμα είναι να επιβεβαιώσουμε την ισχύ και την ευρωστία της προσέγγισής μας σε αρκετές δεκάδες άτομα διαφόρων εθνοτικών προελεύσεων σε μια συγκριτική μελέτη, για την εφαρμογή μιας ρουτίνας για την γονοτύπηση των ομάδων αίματος σε πολλά γονίδια με μείζονα δομική ποικιλία από την NGS βάση δεδομένων.

## ABSTRACT

Following the discovery of the ABO system, by Karl Landsteiner in 1901, Felix Bernstein to 1924 predicted that heredity mechanism includes three alleles are based on the long arm of chromosome 9 (6-9), location 9q34.1. There are not coding for A and B antigens, but for transferases enzymes that catalyze the addition of monosaccharides in oligosaccharide chains. Subgroups of ABO distinguished by reduced amounts of A, B or O (H) antigens on the surface of red cell. The A subgroups classified by the amount of A antigen, and that amount is reduced by the following order  $A^1$ ,  $A^2$ ,  $A^3$ ,  $A^x$ ,  $A^m$ ,  $A^{el}$ . Similarly, the subgroups of blood group B are classified based on the amount of B antigen, which in turn reduces B,  $B^3$ ,  $B^x$ ,  $B^m$ ,  $B^{el}$ . AB blood type is classified into nine subgroups ( $A^xB$ ,  $A^1B^x$ ,  $A^mB$ ,  $A^1B^m$ ,  $A^{el}B$ ,  $A^1B^{el}$ ,  $cisA^2B^3$ ,  $cisA^2B$ ,  $cisA^1B^3$ ) based on the amount of A and B antigens.

The Yamamoto, et al. cloned and determined their structures. The genotype of the O1 allele differs from the  $A^1$  allele by a single nucleotide deletion in position 261. Two nucleotide substitutions distinguish  $A^1$  from  $A^2$  allele.  $A^1$  with  $O^2$  allele differ in three bases, two of which have as a result an amino acid substitution. The  $A^{el}$  individuals have one allele with IVS6 + 5G-A mutation and  $B^{el}$  individuals possess a B gene with 502C-T mutation. Between the  $A^1$  and B allele there are seven nucleotide substitutions.

For the genetic analysis of the ABO antigenic system we used molecular biology techniques. The polymerase chain reaction-restricted fragment length polymorphism (PCR-RFLP), the PCR-direct sequencing, the PCR- single stranded conformation polymorphism (PCR-SSCP), the PCR- amplification of specific alleles (PASA) or ASPCR and real-time PCR by analysis of melting curves. Therefore, we concluded that the PASA method is rapid, simple and useful to detect the genotype of ABO blood groups and cisAB compared with the PCR-RFLP methods, PCR-direct sequencing and PCR-SSCP. While the real-time PCR technique is especially useful for identifying potential blood  $A^{el}$  and  $B^{el}$  alleles.

Therefore we propose a workflow diagram for the determination of rare blood groups. First, a serological method to be used for rapid screening for the presence of the ABO antigen and antibody. When obtain a result in which the determination of direct blood group is O and reverse blood group gives A or B, we isolated genomic DNA from peripheral blood to implement one of the PCR techniques. In short, the identification of the ABO gene variants associated with ABO subgroups are an important contribution in each individual case and also adds knowledge to the current understanding of genetic factors affecting blood groups.

Then we presented serological methods for determining the ABO blood group as firstly the determination on the working plate. RBC antigens A and B (straight) and the determination of anti-A and anti-B antibodies present in the patient serum (reverse). Secondary, the determination of the blood group of straight and reverse reaction in tubes (*in vitro*). Thirdly, the identification of antigens A, B and D by the method microtubules gel.

The determination of blood group-based DNA is a valuable complementary rather than alternative to traditional pre-transfusion control methods as the method based on the DNA is not entirely robust due to new mutations that arise continuously. The Tandem application, the DNA-based methods and existing methods of analyzing, they will provide a high level of improvements that will help in order to provide a blood group typing and phenotype blood in patients with alloantibodies. In order to override this limitation we described the next generation sequencing method (NGS, next-generation sequencing) for genotyping the genes of the blood groups. The main advantage of this method is that it provides an overview of the diversity of alleles present in multiple genes irrespective of the ethnicity or polymorphisms, and other high performance tools aimed only at several SNPs in the same moment. The next step is to confirm the validity and robustness of our approach to several dozen people of various ethnic backgrounds in a comparative study on the application of a routine for genotyping blood groups in many genes with major structural variety of the NGS database .

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ομότιμη Καθηγήτρια Δρ. Σ. Τραυλού επιστημονική υπεύθυνη του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών *ΘΡΟΜΒΩΣΗ – ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΑ – ΙΑΤΡΙΚΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΓΙΣΕΩΝ* για την ευκαιρία που μου έδωσε να παρακολουθήσω το μεταπτυχιακό αυτό, να αποκτήσω γνώσεις και να γνωρίσω διακεκριμένους επιστήμονες παρακολουθώντας το πρόγραμμα αυτό.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσά μου Επίκουρη Καθηγήτρια κ.Μαριάννα Πολίτου Διευθύντρια της Αιμοδοσίας της Πανεπιστημιακής κλινικής του Αρεταιείου, για την ανάθεση του θέματος της διπλωματικής εργασίας, για την πολύτιμη βοήθεια και επιστημονική καθοδήγησή της που μου παρείχε κατά την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας. Καθώς και για την ευκαιρία να γνωρίσω τον τρόπο λειτουργίας μιας Αιμοδοσίας, αλλά και ειδικότερα την υπευθυνότητα και συνεργασία που χαρακτηρίζει το επαγγελματικό προσωπικό της Αιμοδοσίας του Αρεταιείου.

Επίσης, είμαι ευγνώμων στα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, την Επίκουρη Καθηγήτρια κ.Αργυρή Γιαλεράκη και τη Λέκτορα κ.Σερένα Βαλσάμη για όλες τις γνώσεις που μου μετέδωσαν καθώς και για την βοήθεια και συνδρομή τους κατά την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την βοήθειά τους και την συμπαράστασή τους. Είμαι ευγνώμων για την ολόψυχη αγάπη και υποστήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια. Αφιερώνω αυτή την εργασία στην μητέρα μου.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

|                                                                                                                                          |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>                                                                                                      | <b>15</b> |
| 1.1 Ιστορική Αναδρομή.....                                                                                                               | 15        |
| 1.2 Βιοχημική ανάλυση του ABO συστήματος.....                                                                                            | 19        |
| 1.2.1 Λειτουργίες ερυθροκυτταρικών αντιγόνων.....                                                                                        | 19        |
| 1.2.2 Δομή και Βιοσύνθεση των αντιγόνων του συστήματος ABO.....                                                                          | 20        |
| 1.3 Συχνότητες εμφάνισης των ομάδων αίματος στον πληθυσμό.....                                                                           | 24        |
| 1.3.1 Κατανομή των αντιγόνων ABO στην Ελλάδα.....                                                                                        | 25        |
| 1.3.2 Κατανομή σπάνιων αντιγόνων.....                                                                                                    | 27        |
| 1.4 Γενετική ανάλυση των ABO ομάδων αίματος.....                                                                                         | 27        |
| 1.5 Υποομάδες.....                                                                                                                       | 31        |
| 1.5.1 Υποομάδες των A και B αντιγόνων.....                                                                                               | 31        |
| 1.5.2 Υποομάδες της AB.....                                                                                                              | 32        |
| <b>2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΕΘΟΔΟΙ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>                                                                                       | <b>35</b> |
| 2.1 Αναλυτική περιγραφή των μοριακών μεθόδων που χρησιμοποιούνται σε αυτές τις γονιδιακές μελέτες του συστήματος ABO ομάδας αίματος..... | 35        |
| 2.2 Καταγραφή και ανάλυση των γονιδιακών αλληλόμορφων που εμφανίζονται στο ABO σύστημα μέσω των διαφορετικών τεχνικών PCR.....           | 54        |
| 2.2.1 Ανάλυση των αλληλομόρφων μέσω της PASA μεθόδου.....                                                                                | 55        |
| 2.2.2 Άμεση και ταχεία πολλαπλή PCR μεθόδου για τον πεοσδιορισμό της ABO ομάδας αίματος.....                                             | 61        |
| 2.2.3 Εφαρμογή της πραγματικού χρόνου PCR μεθόδου και ανάλυσης της καμπύλης τήξεως για την ανίχνευση των Ael και Bel ομάδων αίματος..... | 64        |
| 2.3 Ανάλυση γενωμικού DNA σε Ιαπωνικά άτομα, εύρεση αλληλόμορφων του ABO συστήματος.....                                                 | 68        |
| 2.4 Εξελικτική σχέση των ABO αλληλομόρφων.....                                                                                           | 74        |
| 2.5 Εξωτερική αξιολόγηση ποιότητας (EQA) στη μοριακή ανοσοαιματολογία: INSTAND το πρόγραμμα δοκιμών ικανότητας.....                      | 76        |
| <b>3 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Ορολογικές μέθοδοι προσδιορισμού της ABO ομάδας αίματος.....</b>                                                        | <b>77</b> |

|                                                                                                                                                         |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.1 Προσδιορισμός της ομάδας αίματος στην πλάκα.....                                                                                                    | 80         |
| 3.2 Προσδιορισμός της ομάδας αίματος σε σωληνάκια ( <i>in vitro</i> ).....                                                                              | 83         |
| 3.3 Προσδιορισμός των αντιγόνων A, B και D με την μέθοδο μικροσωληναρίων γέλης.....                                                                     | 88         |
| <b>4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Γονοτύπηση των ερυθρών κυττάρων και το μέλλον του προμεταγγισιακού ελέγχου.....</b>                                                   | <b>90</b>  |
| 4.1 Γονίδια της ομάδα αίματος που κωδικοποιούν πολυμορφικά αντιγόνα συνήθως διεγείρουν αντισώματα κλινικής σημασίας.....                                | 92         |
| 4.2 Προσδιορισμός των αντιγόνων του συστήματος ABO με μεθόδους που βασίζονται στο DNA.....                                                              | 93         |
| 4.3 Εφαρμογές της γονοτύπησης των ερυθροκυττάρων στην καθημερινή πρακτική των μεταγγίσεων.....                                                          | 95         |
| 4.4 Η μοριακή συμβατότητα των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι ανώτερη της ορολογικής σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία.....                            | 99         |
| 4.5 Αφομοίωση της γονοτύπησης των ερυθρών κυττάρων στην καθημερινή πρακτική.....                                                                        | 100        |
| 4.6 Μια καινούργια παραλλαγή του ABO γονιδίου οδηγεί σε αντιφατικά αποτελέσματα της ευθύς/ ανάστροφης και Μοριακής ταυτοποίησης της ομάδας αίματος..... | 102        |
| 4.7 ABO γονοτυπηση, τυπικές κλινικές εφαρμογές και ο ρόλος της σήμερα.....                                                                              | 104        |
| 4.8 Η επόμενη γενιάς αλληλούχηση είναι μια αξιόπιστη στρατηγική για την γονοτύπηση των ομάδων αίματος.....                                              | 105        |
| <b>5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:.....</b>                                                                                                                            | <b>107</b> |
| <b>6. ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ:.....</b>                                                                                                                       | <b>113</b> |
| <b>7. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΟΝΥΜΑ:.....</b>                                                                                                      | <b>114</b> |
| <b>8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>                                                                                                                             | <b>115</b> |

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Εικόνα 1.</b> Πάππας Ιννοκέντιος ο Ι, 1492. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 15 |
| <b>Εικόνα 2.</b> Σκίτσο από την έκδοση του 1628 της πραγματείας του Harvey που απεικονίζει το μονόδρομο σύστημα βαλβίδων στις φλέβες και το ρόλο του στην κυκλοφορία του αίματος.....                                                                                                                                                                                                                           | 16 |
| <b>Εικόνα 3.</b> Major, μετάγγιση σε δοχείο .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 16 |
| <b>Εικόνα 4.</b> Πολεμική περίοδο για τη μετάγγιση που στηρίχθηκε στο γεγονός των συχνών θανατηφόρων συμβαμάτων .....                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 17 |
| <b>Εικόνα 5.</b> Το 1818 ο Βρετανός μαιευτήρας James Blundell (δεξιά) πραγματοποιεί την πρώτη -με επιστημονική αναφορά- επιτυχή ανθρώπινη μετάγγιση αίματος με τη συσκευή μετάγγισης αίματος (αριστερά) .....                                                                                                                                                                                                   | 18 |
| <b>Εικόνα 6.</b> Karl Landsteiner, Αυστριακός επιστήμονας, 1901.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 18 |
| <b>Εικόνα 7.</b> Μοντέλο των συστατικών της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθροκυττάρων που φέρουν αντιγόνα των ομάδων αίματος. α) Μονό πέρασμα των αντιγόνων από τη μεμβράνη, β) πολλαπλό πέρασμα, γ) αντιγόνα συνδεδεμένα με GPI πρωτεΐνη. Τα συστήματα Ch/Rg και Schiamma των ομάδων αίματος, δεν φαίνονται σε αυτή την εικόνα.....                                                                              | 20 |
| <b>Εικόνα 8.</b> Η τρεις γλυκοσυλτρανσφεράσες, που αποτελούν σύμπλεγμα υδρογονανθράκων τα οποία συνδέονται σε γλυκοπρωτεΐνες ή γλυκολιπίδια στην επιφάνεια των ερυθρών ή άλλων κυττάρων.....                                                                                                                                                                                                                    | 21 |
| <b>Εικόνα 9.</b> Βιοσύνθεση των ABO αντιγόνων. Fuc: L-φουκόζη, Gal: D-γαλακτόζη, GalNAc: N-ακέτυλογαλακτοζαμίνη, GlcNAc: N-ακέτυλογλυκοζαμίνη.....                                                                                                                                                                                                                                                              | 22 |
| <b>Εικόνα 10.</b> Χημική δομή των αντιγόνων H, A και B στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων α) το H αντιγόνο, β) το A αντιγόνο, γ) το B αντιγόνο.....                                                                                                                                                                                                                                                              | 23 |
| <b>Εικόνα 11</b> Ποσοστό εμφάνισης των ομάδων αίματος του ABO συστήματος παγκοσμίως.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 25 |
| <b>Εικόνα 12.</b> Τα συστήματα των ομάδων αίματος και η θέσης τους πάνω στα χρωμοσώματα. Η τοποθεσία των γονιδίων που κωδικοποιούν τις ομάδες αίματος απεικονίζεται σε αυτά τα 15 χρωμοσώματα .....                                                                                                                                                                                                             | 28 |
| <b>Εικόνα 13.</b> Δομή της περιοχής του ABO γονιδίου και της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των A, B και O αλληλομόρφων. Σχεδιάγραμμα της οργάνωσης των εξονίων της κωδικοποιούσας πρωτεϊνικής αλληλουχίας (άνω γκρίζα περιοχή). Τελείως διαφορετική αμινοξική αλληλουχία προκύπτει στο O αλληλόμορφο λόγω της αλλαγής του πλαισίου ανάγνωσης που προκαλείται από την έλλειψη μίας βάσης (κάτω γκρίζα περιοχή)..... | 29 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Εικόνα 14.</b> Δομή της περιοχής του ABO γονιδίου και των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των A, B και cisAB αλληλομόρφων. Διάγραμμα της οργάνωσης των εξονίων της κωδικοποιούμενης πρωτεϊνικής αλληλουχίας (άνω γκρί περιοχή).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 34 |
| <b>Εικόνα 15.</b> Αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην εφαρμογή της PCR μεθόδου.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 37 |
| <b>Εικόνα 16</b> Σχηματική αναπαράσταση της αρχής λειτουργίας της PCR μεθόδου ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 38 |
| <b>Εικόνα 17.</b> Περιοριστικό ένζυμο EcoRI υποδεικνύεται που κόβει όταν συναντά την αλληλουχία GAATTC παράγοντας ατελή άκρα.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 39 |
| <b>Εικόνα 18.</b> Πέψη με περιοριστικό ένζυμο MstI, ηλεκτροφόρηση και ανάλυση Southern.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 40 |
| <b>Εικόνα 19.</b> Η όλη διαδικασία ανάλυσης RFLP.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 40 |
| <b>Εικόνα 20.</b> Η αυτοραδιογραφία Southern Blot δείχνει ότι μία DNA αλληλουχία ομόλογη της αλληλουχίας του ανιχνευτή που δημιουργήθηκε από το άτομο 10 είναι παρόν στα άτομα 3, 4 και 8 με αναμενόμενο μέγεθος 400bp, ενώ απουσιάζει από τα άτομα 1, 2, 5 και 9. Στο άτομο 6, η ομόλογη αλληλουχία είναι επίσης παρόν, αλλά ως δύο ζώνες (300bp η μία και 100bp η άλλη). Αυτό υποδεικνύει ότι η ομόλογη αλληλουχία υπάρχει σε αυτό το άτομο, αλλά έχει μία επιπλέον περιοριστική θέση που κόβει το θραύσμα σε 2 μικρότερα συνολικού μήκους 400bp. Συνεπώς το άτομο 6 δείχνει ένα πολυμορφισμό μήκους θραυσμάτων, υποδηλώνοντας μια ποικιλομορφία στην συγκεκριμένη αλληλουχία μεταξύ των ατόμων. Δεξιά είναι η σχηματική αναπαράσταση της αυτοραδιογραφίας..... | 44 |
| <b>Εικόνα 21.</b> Αλληλούχηση του DNA (sequencing).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 44 |
| <b>Εικόνα 22.</b> Πρόγραμμα Αλληλούχησης του DNA (sequencing).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 46 |
| <b>Εικόνα 23.</b> Χρωματόγραμμα αλληλουχίας DNA.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 48 |
| <b>Εικόνα 24.</b> Η καμπύλη πολλαπλασιασμού της πραγματικού χρόνου PCR.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 48 |
| <b>Εικόνα 25.</b> Εύρος περιοχής ανιχνευσης της QPCR σε σχέση με την κλασική PCR...51                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 51 |
| <b>Εικόνα 26.</b> Ηλεκτροφορητικά πρότυπα των προϊόντων PCR σε έξι σημαντικούς ABO γονότυπους. Γενωμικό DNA που εξάγεται από λευκοκύτταρα, ενισχύθηκε με τη μέθοδο PASA χρησιμοποιώντας 4 σετ εκκινητών/primer (primer 1 και 2, primer 3 και 4, primer 5 και 6, και primer 7 και 8, ). Με τη, Hae III έκοψαν το πλασμιδιακό DNA pBR322 και το χρησιμοποίησαν ως marker. Το πάνελ δείχνει ABO συγκεκριμένα αλληλόμορφα.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 52 |

**Εικόνα 27.** Ηλεκτροφορητικά πρότυπα των προϊόντων PCR σε τρεις σημαντικούς cisAB γονότυπους. Γενωμικό DNA που εξάγεται από λευκοκύτταρα, ενισχύθηκε με τη μέθοδο PASA χρησιμοποιώντας 5 σετ εκκινητών/primer (primer 1 και 2, primer 3 και 4, primer 5 και 6, primer 7 και 8, και primer 9 και 10). Οι, Hae III έκοψαν το πλασμιδιακό DNA pBR322 και το χρησιμοποίησαν ως marker. Το πάνω πάνελ δείχνει ABO συγκεκριμένα αλληλόμορφα και το κάτω πάνελ cisAB συγκεκριμένα αλληλόμορφα.....53

**Εικόνα 28.** Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου ενίσχυσης και ανάλυσης συγκεκριμένων ABO αλληλομόρφων χρησιμοποιώντας την PASA μέθοδο. Τα 3' άκρα των primer(εκκινητών) 2, 3 και 4, 6, 7, 9 και 10 αντιστοιχούν προς τις αλληλουχίες των νουκλεοτιδίων O, A και B, B, A και O, και cisAB αλληλομόρφων αντίστοιχα. Οι primers 1, 5 και 8 αντιστοιχούν στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των ABO αλληλομόρφων. Αλληλόμορφο-ειδικών θραυσμάτων DNA του O αλληλομόρφου (104 bp), A και B αλληλόμορφα (52bp), B αλληλόμορφο (224bp), A και O αλληλόμορφο (379bp) και cisAB (55bp) ενισχύθηκαν μέσω της PCR μεθόδου με 5 ζευγάρια primers (primer 1 και 2, primer 3 και 4, primer 5 και 6, primer 7 και 8, και primer 9 και 10), αντίστοιχα. Τρία (104 bp, 224bp και 379bp) ή πέντε κομμάτια είχαν συνενισχυθεί σε μία μόνο PCR-1 (multiplex-PCR).....58

**Εικόνα 29.** ABO γονοτύπιση, θέσεις εκκινητών και μέγεθος προϊόντων. Τα σημεία κλειδιά των πολυμορφισμών υποδεικνύονται στις θέσεις 261, 802, 803 και 1059. Γράφοντας τα νούμερα με τη μορφή *italics* πάνω από το A1 διάγραμμα υποδεικνύεται οι νουκλεοτιδικές θέσεις στα όρια του εξωνίου 6 και 7. Ονόματα και σχετικές θέσεις για τις + αντιδράσεις των συναινετικών και ειδικών για τα αλληλόμορφα εκκινητών υποδεικνύονται επίσης. Η αντίστοιχη – αντίδραση των εκκινητών (δεν απεικονίζεται) τοποθετείται στην ίδια θέση και στην ίδια κατεύθυνση με την + αντίδραση του ομόλογού του. Παρόλα αυτά το 3' τελικό νουκλεοτίδιο είναι συμπληρωματικό με την αλληλουχία του A1 αλληλομόρφου.....58

**Εικόνα 30.** ABO γονοτύπιση μέσω της ASPCR μεθόδου. Τα προϊόντα των + αντιδράσεων βρίσκονται στην πρώτη γραμμή κάθε ζευγαριού. Τα προϊόντα των – αντιδράσεων βρίσκονται στη δεύτερη γραμμή. Από τα αριστερά προς τα δεξιά οι γονότυποι A<sup>1</sup>A<sup>1</sup>, O<sup>1</sup>O<sup>1</sup>, BB, BO<sup>1</sup>, A<sup>1</sup>O<sup>2</sup>, O<sup>1</sup>O<sup>2</sup>, A<sup>1</sup>O<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>O<sup>1</sup> και A<sup>1</sup>B υποδεικνύονται.....62

**Εικόνα 31** Το ηλεκτροφερόγραμμα έξι κοινών ABO γονότυπων σε έναν κορεάτικο πληθυσμό: AA, AO, BB, BO, OO, και AB. Χρησιμοποιώντας εκκινητές ειδικούς για ζεύγη αλληλομόρφων που έχουν τροποποιηθεί στο άκρο 5'A, η πολλαπλή PCR στο σύνολο αυτής της μελέτης διευκολύνει την ABO γονοτύπιση επιτρέποντας ταυτόχρονα διάφορα αλληλόμορφα την παραγωγή ενισχυμένων προϊόντων διαφορετικών μεγεθών. Η έλλειψη νουκλεοτιδίου στη θέση 261 υποδεικνύεται από την ένδειξη " del ".....62

**Εικόνα 32.** Διάγραμμα που δείχνει το ταχύ και άμεσο πρωτόκολλο PCR για τον ABO προσδιορισμό της ομάδας αίματος από τη συλλογή του δείγματος για ηλεκτροφορησιογράφημα.....63

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Εικόνα 33.</b> Αντιπροσωπευτικό ηλεκτροφερόγραμμα ταχείας και άμεσης PCR για την ABO γονοτύπηση με φρέσκες κηλίδες αίματος, μαλλιά και σωματικά υγρά. Αυτό το πρωτόκολλο ABO γονοτύπησης επιτρέπει τον άμεσο χαρακτηρισμό του αίματος, τρίχας, και τα δείγματα σιέλου χρησιμοποιώντας μόνο 1 μl του αίματος, μια ρίζα της τρίχας, ή μια γροθιά 1,2 mm, διάμετρος του αίματος ή λεκέ από σάλιο, χωρίς προηγούμενη απομόνωση του DNA, σε περίπου 70 λεπτά , με καλή θέση στη θέση ισορροπίας, καλές αναλογίες ύψος κορυφής ετεροζυγωτών, και καμία θέση εγκατάλειψης..... | 63 |
| <b>Εικόνα 34.</b> Ανάλυση καμπύλης τήξεως για την ανίχνευση Ael και Bel ομάδων αίματος.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 67 |
| <b>Εικόνα 35.</b> Διάγραμμα ροής εργασίας που μπορεί να αντικαταστήσει την δοκιμασία απορρόφησης-έκλουσης, η οποία είναι χρονοβόρα και λιγότερο ακριβείς.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 68 |
| <b>Εικόνα 36.</b> Σχήματα που υποδεικνύουν την προέλευση των (Α) ABO*R101 και (Β) ABO*A110 αλληλομόρφων.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 75 |
| <b>Εικόνα 37.</b> Προσδιορισμός της ομάδας αίματος του ασθενούς με βάση το εναιώρημα ερυθρών του. Χρησιμοποιήσαμε 1 σταγόνα από τους αντιορούς αντι-B, αντι-A και αντι-AB αντίστοιχα. Αποτέλεσμα η μη συγκόλληση των ερυθρών. Ομάδα αίματος του ασθενούς O. (Θα επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα αυτό κάνοντας και τον ανάστροφο προσδιορισμό της ομάδας αίματος παρακάτω).....                                                                                                                                                                                                  | 81 |
| <b>Εικόνα 38.</b> Ανάστροφη διαδικασία προσδιορισμού της ομάδας αίματος του ασθενούς. Τα πρότυπα ερυθρά A και B που χρησιμοποιήσαμε αντιδρούν με τον ορό του ασθενούς προκαλώντας συγκολλήσεις. Ομάδα αίματος ασθενούς O.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 82 |
| <b>Εικόνα 39.</b> Το αντίσωμα IgM έχει τη δυνατότητα να συλλαμβάνει και να συγκολλά δύο ή περισσότερα ερυθρά αιμοσφαίρια.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 84 |
| <b>Εικόνα 40.</b> Το IgG αντίσωμα έχει την ικανότητα να συνδεθεί με ερυθρά αιμοσφαίρια αλλά δε δύναται πάντα να τα συγκολλάει.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 85 |
| <b>Εικόνα 41.</b> Συγκόλληση των ερυθροκυττάρων με χρήση του αντιορού αντι-A, θετικό αποτέλεσμα. Ύπαρξη αντιγόνου A στην επιφάνεια των ερυθρών του ασθενούς. Ασθενής ομάδας αίματος A.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 86 |
| <b>Εικόνα 42.</b> Προσδιορισμός της ABO ομάδας του ασθενούς χρησιμοποιώντας την τεχνική γέλης. Το A αντιγόνο σαφώς απουσιάζει (αξιολόγηση του αποτελέσματος ως - ). Η συγκόλληση του Αντι-B αντιορού με το B αντιγόνο ήταν κανονικός (4+). Το ίδιο ισχύει και για τον αντιορό αντι-AB (4+). Ασθενής ομάδας αίματος B+.....                                                                                                                                                                                                                                                 | 89 |
| <b>Εικόνα 43.</b> Δομή της ABO γλυκοσυλτρανσφεράσης. Κατάλοιπα αμινοξέων που διαφέρουν μεταξύ της ομάδας αίματος A και B-ενεργό τρανσφεράσης, αντίστοιχα (Arg176Gly, Gly235Ser, Leu266Met, Gly268Ala) εμφανίζονται με τον κώδικα ενός                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |

γράμματος και οι θέσεις τους υποδεικνύονται. Το τρισδιάστατο μοντέλο δημιουργήθηκε με το ελβετικό DeepView Pdb. Viewer έκδοση 3.7.....101

**Εικόνα 44.** Γονοτύπηση των ερυθρών κυττάρων για τα SNPs των ομάδων αίματος. Περιγραφή μιας μεθόδου για τον καθορισμό των SNPs των ομάδων αίματος που βασίζεται σε αυτό ο Karpasitou et al. Πολλές άλλες μέθοδοι είναι διαθέσιμες. Αυτή η μέθοδος απεικονίζεται διότι είναι κατάλληλη για την "in-house" ανάπτυξη .....101

**Εικόνα 45.** Εξομοίωση των ερυθρών κυττάρων του γονότυπου στη συνήθη πρακτική. (Α) απεικονίζει ένα σενάριο για την ενσωμάτωση των ερυθρών κυττάρων του γονότυπου στη συνήθη πρακτική που βασίζεται στην τεχνολογία που διατίθενται σήμερα. Είναι επίσης δυνατή η εξέταση του DNA με βάση μπορούσαν να αναληφθούν στην τράπεζα αίματος ή άλλο εργαστήριο. (Β) απεικονίζει ένα πιθανό μελλοντικό σενάριο, υποθέτοντας γενετικού ελέγχου με συστοιχίες DNA για να προσδιορίσουν την ευαισθησία της νόσου θα γίνει ρουτίνα και ένα γενετικό τεστ επιτρέπει τον εντοπισμό των ασθενών (ανταποκρινόμενοι) ενδέχεται να αλλοαντισωμάτων των αντιγόνων των ομάδων αίματος θα είναι διαθέσιμες.....102

**Εικόνα 46.** Ανάλυση της αλληλουχίας του ABO εξονίου 6 στο DNA του ασθενούς. Ετεροζυγωτίες παρατηρήθηκαν στη θέση 248A> G (νέα παραλλαγή) και 261G> del (O1 αλληλόμορφο). Η διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει την περιοχή δέσμευσης του προς τα εμπρός PCR-SSP εκκινητή ειδικό για το O1 (261 del) και το μη O1 αλληλόμορφο (261G).....103

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

|                                                                                                                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Πίνακας 1.</b> Από το AABB τεχνικό εγχειρίδιο- Αμερικανικός Ερυθρός Σταυρός. Μελέτη του 2015.....                                                                  | 24  |
| <b>Πίνακας 2.</b> Ποσοστά εμφάνισης των ομάδων αίματος του ABO συστήματος στον Ελληνικό πληθυσμό .....                                                                | 25  |
| <b>Πίνακας 3.</b> Ανθρώπινα αντιγονικά συστήματα των ομάδων αίματος .....                                                                                             | 26  |
| <b>Πίνακας 4.</b> Μελέτη του 2015. Κέντρο Αίματος του Ειρηνικού .....                                                                                                 | 27  |
| <b>Πίνακας 5.</b> Έκφραση των ABO αντιγόνων ανα μονάδα επιφάνειας ερυθροκυττάρου.....                                                                                 | 32  |
| <b>Πίνακας 6.</b> Σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των αλληλομόρφων των A, B και AB υποομάδων.....                                                             | 34  |
| <b>Πίνακας 7.</b> Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της PCR-RFLP μεθόδου.....                                                                                           | 41  |
| <b>Πίνακας 8.</b> Τα πρότυπα αποτελέσματα των PASA μεθόδων για όλους τους πιθανούς ABO γονότυπους.....                                                                | 53  |
| <b>Πίνακας 9.</b> Ειδικοί για τα αλληλόμορφα εκκινητές για την γονοτύπιση των A <sup>1,2</sup> , B, O <sup>1,2</sup> .....                                            | 56  |
| <b>Πίνακας 10.</b> Γονοτύπιση προτύπων για τα A1, A2, O1, O2 και B αλληλόμορφα.....                                                                                   | 56  |
| <b>Πίνακας 11.</b> Σχέση μεταξύ των αμινοξικών αλληλουχιών των τρानσφερασών και των παραγόμενων ABO χαρακτήρων που προκύπτουν από τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες..... | 72  |
| <b>Πίνακας 12.</b> Χρήσιμες εφαρμογές της γονοτύπισης των ερυθρών κυττάρων στην ιατρική των μεταγγίσεων.....                                                          | 96  |
| <b>Πίνακας 13.</b> Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων.....                                                                    | 114 |

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **1.1: Ιστορική αναδρομή**

Στους αρχαίους χρόνους πολλοί λαοί αποδώσανε στο αίμα μαγικές ή θεραπευτικές ιδιότητες. Οι Αρχαίοι Έλληνες και οι Λατίνοι γνώριζαν τη μετάγγιση. Ο Αριστοτέλης έλεγε: το αίμα περιέχει " ζωοποιό πνεύμα " που εμφυσούσε ζωή στα ζώα. Εκείνη την περίοδο η πιο προφανής είσοδος αίματος στο σώμα θεωρείτο η στοματική κοιλότητα, όπως υποστήριζε π.χ. ο Γαληνός, και όχι το φλεβικό σύστημα. Στους Ρωμαϊκούς χρόνους και στο Μεσαίωνα υπήρχε η λαϊκή αντίληψη ότι το αίμα διατηρεί την υγεία, τονώνει και παρατείνει τη νεότητα. [1]

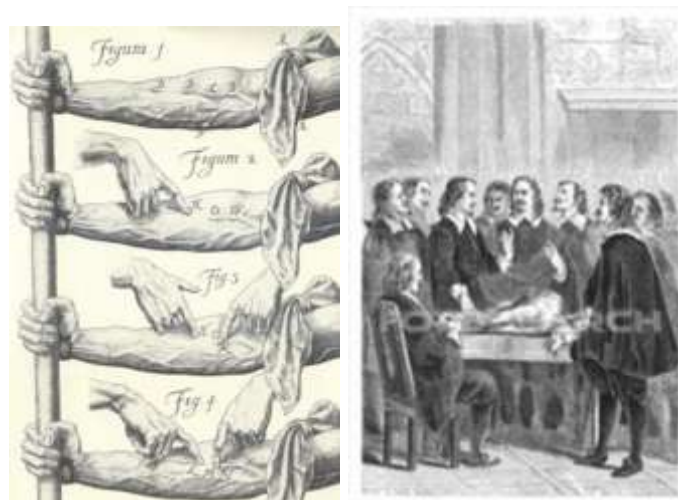
Περιστασιακές προσπάθειες μετάγγισης εμφανίζονται στα χρόνια της Βυζαντινής Αυτοκρατορίας και της Αναγέννησης, υπήρχε όμως καθυστέρηση στα πειράματα μετάγγισης μέχρι να γίνει αποδεκτή η ιδέα της κυκλοφορίας του αίματος. Σαν πρώτη προσπάθεια μετάγγισης αίματος περιγράφεται η γενόμενη το 1492 στον Πάπα Ιννοκέντιο τον Ι'. Ο χρονικογράφος Stefano Infessura περιγράφει ότι Εβραίος ιατρός αφαίμαξε τρία δεκάχρονα παιδιά και πρότεινε να δώσει το αίμα τους στον ετοιμοθάνατο Πάπα από το στόμα για να ξανανιώσει. Αμφισβητείται αν η μετάγγιση πραγματοποιήθηκε τελικά ή αν ο άρρωστος Πάπας αρνήθηκε το μέσο αυτό, τα τρία παιδιά όμως πέθαναν και ο γιατρός φυγαδεύθηκε. [2]



**Εικόνα 1:** Πάπας Ιννοκέντιος ο Ι, 1492. [2]

Η πρώτη πάντως καθορισμένη και λεπτομερής περιγραφή της τεχνικής της μετάγγισης βρίσκεται σε πραγματεία του Γερμανού χημικού Ανδρέα Libanius (1615). Κατά τους Ιταλούς όμως, η προτεραιότητα ανήκει στο γιατρό Jean De Colle (1628) από την Πάδοβα. [3]

Η ανακάλυψη της κυκλοφορίας του αίματος από τον Harvey το 1628 αποτελεί σταθμό για τη μετάγγιση. [3]



**Εικόνα 2:** Σκίτσο από την έκδοση του 1628 της πραγματείας του Harvey που απεικονίζει το μονόδρομο σύστημα βαλβίδων στις φλέβες και το ρόλο του στην κυκλοφορία του αίματος. [4]

Το 1665 καταγράφεται επιτυχής μετάγγιση στην Αγγλία. Ο ιατρός Richard Lower διατηρεί στη ζωή ένα σκύλο με μετάγγιση αίματος από άλλους σκύλους. Το 1795 στη Φιλαδέλφεια, ο Αμερικανός ιατρός Philip Syng Physick υποστηρίζει πως κατάφερε να εφαρμόσει την πρώτη ανθρώπινη μετάγγιση αίματος, αν και δεν δημοσιεύει αυτή την πληροφορία. Από τότε πολλοί δοκίμασαν μεταγγίσεις αίματος κυρίως από ζώα σε ανθρώπους και από άνθρωπο σε άνθρωπο, και από αρτηρία σε φλέβα. [5]



**Εικόνα 3:** Major, μετάγγιση σε δοχείο. [5]

Η τιμή της διενέργειας της πρώτης πραγματικής μετάγγισης από άνθρωπο σε άνθρωπο ανήκει στο Major ο οποίος δεν έκανε απευθείας μετάγγιση, αλλά συνέλεξε το αίμα για τη μετάγγιση σε δοχείο. [6]



**Εικόνα 4:** Πολεμική περίοδο για τη μετάγγιση που στηρίχθηκε στο γεγονός των συχνών θανατηφόρων συμβαμάτων. [6]

Στη συνέχεια αρχίζει ζωηρή πολεμική περίοδο για τη μετάγγιση που στηρίχθηκε στο γεγονός των συχνών θανατηφόρων συμβαμάτων που παρατηρήθηκαν. Αυτό οφειλόταν στο ότι το αίμα που χρησιμοποιούσαν ήταν συχνά άλλης ομάδας και οι κανόνες της ασηψίας ήταν άγνωστοι. Έτσι η μετάγγιση λησμονήθηκε για περίπου δύο αιώνες.

Το ενδιαφέρον για τη μετάγγιση αναγεννάται το 19ο αιώνα. Σε σειρά πειραματικών εργασιών, διαπιστώνεται ότι η μετάγγιση αίματος ζώου σε άνθρωπο ή ζώου σε άλλου είδους ζώο είναι επικίνδυνη και πρέπει να εγκαταλειφθεί. Η χρησιμοποίηση της σύριγγας για τη μετάγγιση, αποτέλεσε ένα νέο σημαντικό σταθμό στην ιστορία της μετάγγισης. Η αναστόμωση αρτηρίας με φλέβα καταργείται, το

αίμα συλλέγεται μέσα σε δοχεία και εγχέεται με τη βοήθεια μιας σύριγγας. Η μετάγγιση αρχίζει να χρησιμοποιείται κυρίως σε αιμορραγίες. Το 1818 ο Βρετανός μαιευτήρας James Blundell πραγματοποιεί την πρώτη -με επιστημονική αναφορά- επιτυχή ανθρώπινη μετάγγιση αίματος για τη θεραπεία μιας ασθενούς με αιμορραγία κατόπιν τοκετού (Νοσ.Guy's and Thomas του Λονδίνου). [7]



**Εικόνα 5:** Το 1818 ο Βρετανός μαιευτήρας James Blundell (δεξιά) πραγματοποιεί την πρώτη -με επιστημονική αναφορά- επιτυχή ανθρώπινη μετάγγιση αίματος με τη συσκευή μετάγγισης αίματος (αριστερά). [7]

Χρησιμοποίησε τον άνδρα της ως αιμοδότη, του αφαίρεσε 0,1 λίτρο αίματος το οποίο μετάγγισε με σύριγγα επιτυχώς στην σύζυγο. Στο διάστημα 1825-1835 πραγματοποίησε 10 μεταγγίσεις από τις οποίες οι πέντε αποδείχθηκαν καλές και δημοσίευσε αυτά τα αποτελέσματα.

Ο σημαντικότερος σταθμός στην ιστορία της μετάγγισης θεωρείται η ανακάλυψη του συστήματος ABO, που αποτελεί και το σημαντικότερο από τα 30 συστήματα ομάδων αίματος[8, 9] (Πίνακας 3), από τον Αυστριακό επιστήμονα, Karl Landsteiner το 1901.[10] Εκείνος βρήκε 3 διαφορετικούς τύπους αίματος (Α, Β και Ο) από ορολογικές διαφορές στο αίμα που ονομάζονται οι νόμοι του Landsteiner.



**Εικόνα 6:** Karl Landsteiner, Αυστριακός επιστήμονας, 1901.[11]

Συγκεκριμένα, ο Landsteiner πήρε δείγματα αίματος από τους συναδέλφους του, χώρισε τον ορό από τα κύτταρα, έκανε εναιώρημα κυττάρων και ανέμειξε τον ορό του καθενός με τα εναιωρήματα των υπολοίπων. Τότε παρατήρησε ότι άλλα μείγματα έκαναν συγκόλληση και άλλα όχι. Τα συμβάματα που παρατηρούνται αποδίδονται σε αιμόλυση του χορηγούμενου ασύμβατου, δηλαδή άλλης ομάδας αίματος, από τις συγκολλητίνες του δέκτη. Με τη μέθοδο αυτή, κατηγοριοποίησε τα δείγματα σε τρεις ομάδες, τις A, B και O. Για αυτή την ανακάλυψη ο Landsteiner τιμήθηκε το 1930 με το βραβείο NOBEL.[12]

Δύο χρόνια αργότερα προστέθηκε και η τέταρτη ομάδα AB από τους Sturli και Decastello[13]. Επίσης, ο Landsteiner διαπίστωσε πως με την παρουσία ή την απουσία δύο μονάχα αντιγόνων, των A και B, ήταν δυνατό να αποτυπωθεί η ύπαρξη 4 ομάδων αίματος. Ακόμα ανακάλυψε ότι στον ορό κάθε ανθρώπου περιέχεται κάποιο αντίσωμα που ενεργεί εναντίον των αντιγόνων τα οποία απουσιάζουν από τα ερυθρά αιμοσφαίρια του συγκεκριμένου ατόμου (δηλαδή αν είναι ομάδας A περιέχει αντισώματα αντι-B).[14]

## **1.2 Βιοχημική ανάλυση του ABO συστήματος:**

Η δομή της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων (Εικ.7), σχηματίζεται από λιπίδια και πρωτείνες.[15] Τα λιπίδια είναι τοποθετημένα με τη μορφή διπλής στοιβάδας (διπλοστοιβάδα). Από τις πρωτείνες άλλες είναι διαμεμβρανικές και άλλες όχι. Βασικές πρωτείνες της μεμβράνης είναι οι γλυκοφορίνες A και B και η πρωτεΐνη 3. Αυτές διεκπεραιώνουν αρκετές λειτουργίες του κυτάρου αλλά ταυτόχρονα έχουν κυρίαρχο ρόλο σαν αντιγόνα. [16]

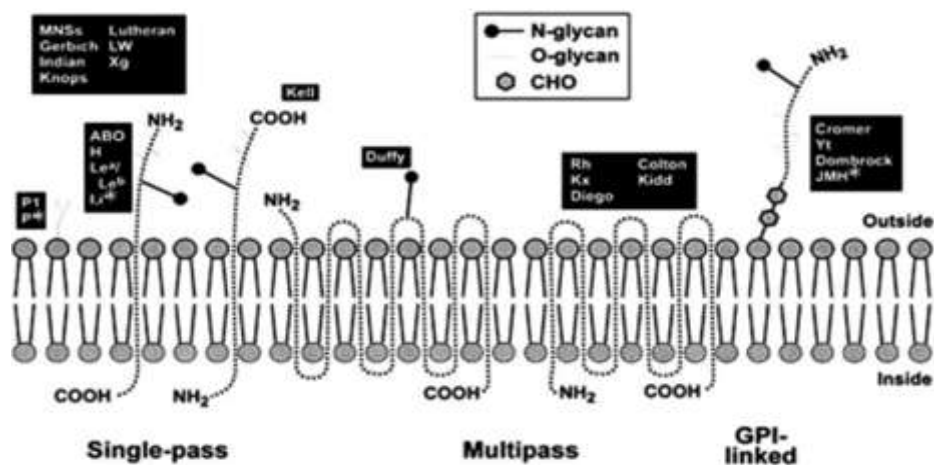
### **1.2.1. Λειτουργίες ερυθροκυτταρικών αντιγόνων:**

- Μεταφορείς/Κανάλια: Μεταφέρουν υδατοδιαλυτά μόρια/χημικές ενώσεις. Τέτοια αντιγόνα είναι τα Rh, Colton, Diago, Kx, Kidd
- Υποδοχείς: Βιολογικοί (Duffy, Knops, Indian), Μικροβιακοί (MNS,P, Lewis, Duffy, Cromer)
- Μόρια προσκόλλησης: Leuthran, Xg, LW, Indian

- Ρόλος στην παθοφυσιολογία του συμπληρώματος: Chido/Rodgers, Cromer, Knops
- Ένζυμα: ABO, P, Lewis, H
- Δομικές πρωτεΐνες: Διατηρούν το σχήμα του ερυθροκυττάρου. Τέτοιες είναι οι MNS, Diago, Gerbich.

Οι προαναφερόμενες πρωτεΐνες είναι διαμεμβρανικές, επομένως κάποιο τμήμα τους εξέρχεται της κυτταρικής μεμβράνης. Ανάλογα με την αλληλουχία των αμινοξέων ή των σακχάρων του προεξέχοντος τμήματος, τα κύτταρα αποκτούν ταυτότητα, τα αντιγόνα είναι τα δακτυλικά αποτυπώματα των κυττάρων. Πράγματι αυτά αποτελούν τα συστήματα ομάδων αίματος. Η ερυθροβλάστη, ωριμάζοντας προς ερυθρό αιμοσφαίριο, χάνει έναν πολύ σημαντικό πληθυσμό αντιγόνων. Ωστόσο διατηρούνται αρκετά ώστε να μπορούν να καταταγούν σε 30 διαφορετικά συστήματα ομάδων αίματος.[16]

Συνοψίζοντας, το πρωτεϊνικό τμήμα που εξέρχεται της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης παρέχει στο κύτταρο αντιγονική ικανότητα. Η αλληλουχία των αμινοξέων και των σακχάρων του τμήματος αποτελούν τα ερυθροκυτταρικά αντισώματα ή συγκολλητινογόνα.



**Εικόνα 7:** Μοντέλο των συστατικών της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθροκυττάρων που φέρουν αντιγόνα των ομάδων αίματος. α) Μονό πέρασμα των αντιγόνων από τη μεμβράνη, β) πολλαπλό πέρασμα, γ) αντιγόνα συνδεδεμένα με GPI πρωτεΐνη. Τα συστήματα Ch/Rg και Schiamma των ομάδων αίματος, δεν φαίνονται σε αυτή την εικόνα.[15] (Reid ME et al. 1997)

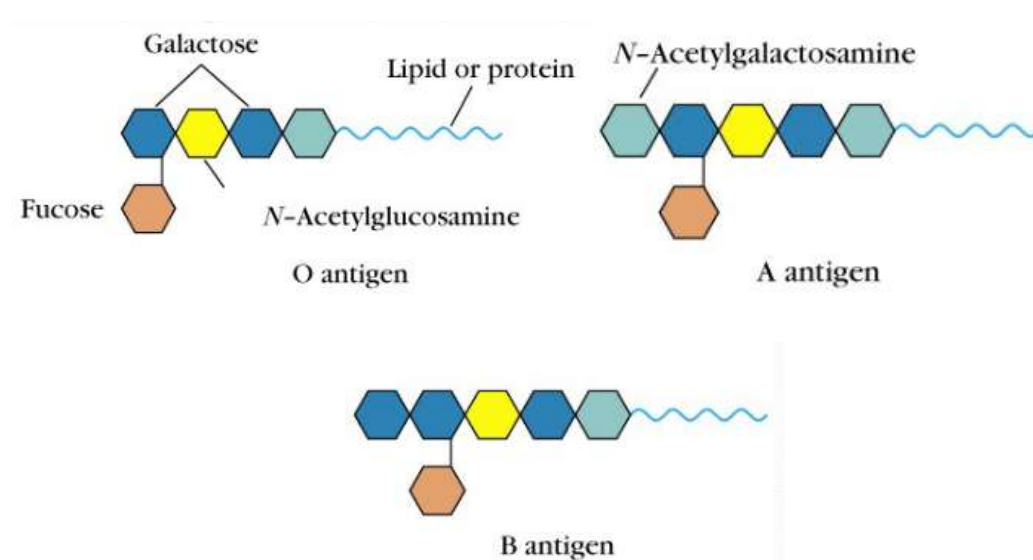
### 1.2.2. Δομή και Βιοσύνθεση των αντιγόνων του συστήματος ABO:

Η μορφή των αντιγόνων του συστήματος ABO καθορίζεται από την αλληλουχία των σακχάρων που συνδέονται με την ερυθροκυτταρική μεμβράνη. Τα σάκχαρα μπορούν να συνδεθούν με τη μεμβράνη με δύο τρόπους. Είτε απευθείας το σάκχαρο ενώνεται με την εξωτερική λιπιδική στοιβάδα, προσκολλάται σε ένα μόριο σφιγγομυελίνης και σχηματίζεται ένα γλυκολιπίδιο, είτε το σάκχαρο συνδέεται με μια πρωτεΐνη σχηματίζοντας γλυκοπρωτεϊνικό δεσμό. Τα ABO αντιγόνα ανήκουν στην κατηγορία των αντιγόνων με ολιγοσακχαρίτες.[17] Αυτά τα αντιγόνα εκφράζονται ευρέως στις μεμβράνες των ερυθροκυττάρων και των ιστών, καθώς και, στο σάλιο και στα σωματικά υγρά.[18]

Τα σάκχαρα που δημιουργούν τις αντιγονικές αλυσίδες είναι 4, δηλαδή:

- N-ακετυλογαλακτοζαμίνη
- D-γαλακτόζη
- N-ακέτυλογλυκοζαμίνη και
- L-φουκόζη

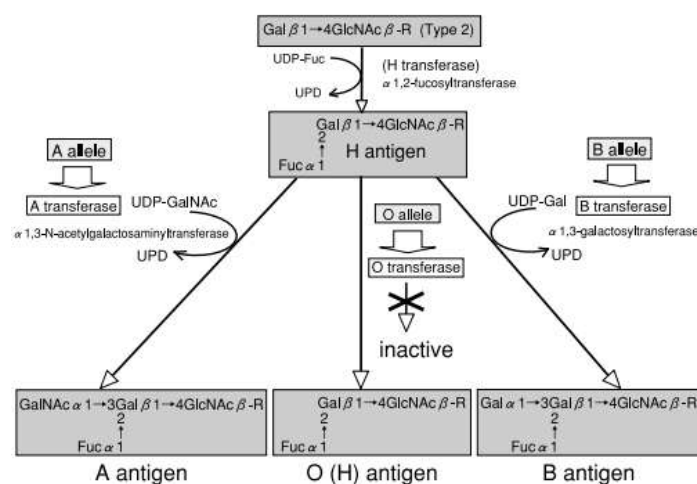
Από αυτά προέρχονται όλες οι ομάδες του συστήματος ABO (Εικ.8). [19]



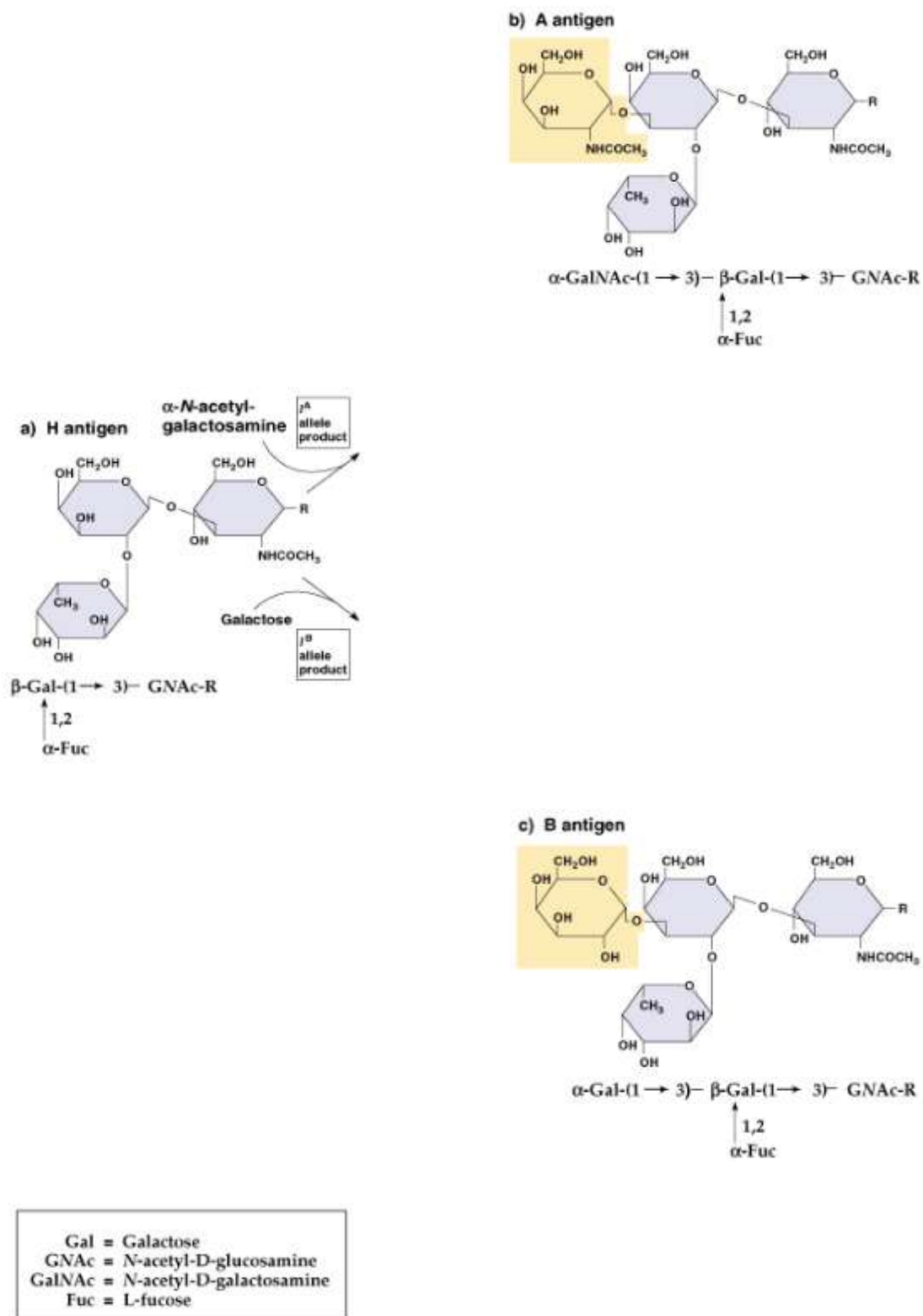
**Εικόνα 8:** Η τρεις γλυκοσυλτρανσφεράσες, που αποτελούν σύμπλεγμα υδρογονανθράκων τα οποία συνδέονται σε γλυκοπρωτεΐνες ή γλυκολιπίδια στην επιφάνεια των ερυθρών ή άλλων κυττάρων.[19]

Όπως φαίνεται στην εικόνα 9, το πρώτο βήμα στην βιοσύνθεση των ABO αντιγόνων είναι η προσθήκη μιας L-φουκόζης σε έναν  $\alpha 1 \rightarrow 2$  δεσμό της τερματικής γαλακτόζης (Gal) ενός κοινού προδρόμου που συνδέεται με λιπίδια ή πρωτεΐνες μέσω της  $\alpha 1,2$ -φουκοσυλτρανσφεράσης (H τρανσφεράση), με αποτέλεσμα το σχηματισμό του αντιγόνου H.

Έξι διαφορετικοί τύποι δομών του κοινού προδρόμου είναι γνωστοί.[20] Οι αλληλουχίες του Τύπου 1 ( $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc}\beta\text{-R}$ ) και Τύπου 2 ( $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta\text{-R}$ ) είναι οι κύριες δομές. Ο τύπος 1 είναι ουσία που βρίσκεται στις εκκρίσεις και στους ιστούς, και ο τύπος 2 είναι αντιγόνο της επιφάνειας των ερυθροκυττάρων. Οι δομές των αντιγόνων A, B, και O (H), στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων ορίζονται ως υδατανθρακικά παράγωγα,  $\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow (\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2)3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta\text{-R}$ ,  $\text{Gala}1 \rightarrow (\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2)3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta\text{-R}$ , και  $(\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2)\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta\text{-R}$ , αντίστοιχα, τα οποία συντίθεται από τη δομή του H αντιγόνου με τη δράση ειδικών γλυκοσυλτρανσφερασών, παράγωγα των ABO γονιδίων. Τα A και B αλληλόμορφα κωδικοποιούν τις γλυκοσυλτρανσφεράσες ( $\alpha 1,3$ -N-ακετυλγαλακτοζαμινυλτρανσφεράση (A τρανσφεράση) και  $\alpha 1,3$ -γαλακτοσυλοτρανσφεράση (B τρανσφεράση)), οι οποίες καταλύουν την προσθήκη ειδικών σακχάρων, N-ακετυλγαλακτοζαμίνη (GalNAc) και γαλακτόζης (Gal) κατάλοιπα, αντίστοιχα, σε έναν  $\alpha 1 \rightarrow 3$  δεσμό στην τερματική Gal του H αντιγόνου[21], [22-24]. Δεδομένου ότι το O αλληλόμορφο κωδικοποιεί πρωτεΐνη που δεν έχει λειτουργία γλυκοσυλτρανσφεράσης (O τρανσφεράση), το H αντιγόνο είναι η μοναδική ABO δομή που υπάρχει στην ομάδα αίματος O[25].



**Εικόνα 9:** Βιοσύνθεση των ABO αντιγόνων. Fuc: L-φουκόζη, Gal: D-γαλακτόζη, GalNAc: N-ακέτυλογαλακτοζαμίνη, GlcNAc: N-ακέτυλογλυκοζαμίνη[12].



**Εικόνα 10:** Χημική δομή των αντιγόνων H, A και B στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων α) το H αντιγόνο, β) το A αντιγόνο, γ) το B αντιγόνο

Έχουμε λοιπόν 4 ομάδες αίματος του ABO συστήματος που καθορίζονται από το συνδυασμό των αντιγόνων που εμφανίζεται στην επιφάνεια της ερυθροκυτταρικής τους μεμβράνης:

- 1) Ομάδα Α παρουσία των αντιγόνων Η και Α.
- 2) Ομάδα Β παρουσία των αντιγόνων Η και Β.
- 3) Ομάδα ΑΒ παρουσία των αντιγόνων Η, Α και Β
- 4) Ομάδα Ο παρουσία του αντιγόνου Η

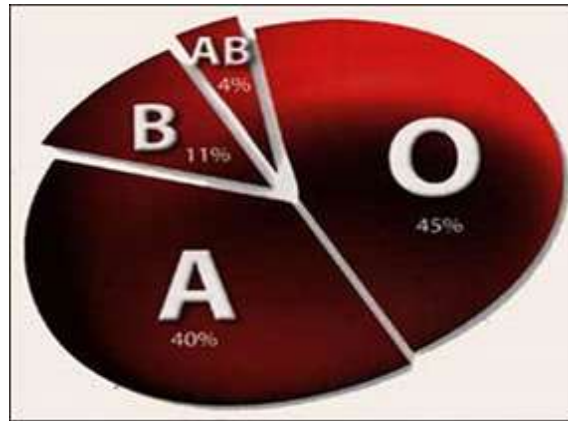
Παρατηρείται ότι το αντιγόνο Η υπάρχει στο σύνολο των κατηγοριών και αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την έκφραση όλων των ομάδων του συστήματος ABO. Ήδη αναφέρθηκε ότι στα άτομα, που τα ερυθρά τους δεν φέρουν κάποιο από τα αντιγόνα (συγκολλητινογόνα) αυτά, ο ορός τους περιέχει αντίσωμα που ενώνεται και αντιδρά με το απόν αντιγόνο(σε περίπτωση συνέρευσης). Ανάλογα με τα αντιγόνα που φέρουν στον ορό τους, κατατάσσουμε τους ανθρώπους σε 4 κύριες ομάδες του συστήματος ABO.[16]

### **1.3. Συγγότιες εμφάνισης των ομάδων αίματος στον πληθυσμό:**

Ενώ ο τύπος Ο θετικό είναι ο πιο κοινός τύπος αίματος. Δεν έχουν όλες οι εθνικότητες τον ίδιο συνδυασμό αυτών των τύπων αίματος. Οι Hispanics, για παράδειγμα, έχουν ένα σχετικά υψηλό αριθμό Ο ομάδας αίματος, ενώ οι Ασιάτες έχουν ένα σχετικά υψηλό αριθμό Β ομάδας.[26] Ο συνδυασμός των διαφόρων τύπων του αίματος στους πληθυσμούς των ΗΠΑ είναι:

**Πίνακας 1:** Από το AABB τεχνικό εγχειρίδιο- Αμερικανικός Ερυθρός Σταυρός. Μελέτη του 2015.[26]

| <b>Ομάδα αίματος</b> | <b>Κauκάσιοι</b> | <b>Αφρο-Αμερικανοί</b> | <b>Ισπανόφωνοι</b> | <b>Ασιάτες</b> |
|----------------------|------------------|------------------------|--------------------|----------------|
| O+                   | 37%              | 47%                    | 53%                | 39%            |
| O-                   | 8%               | 4%                     | 4%                 | 1%             |
| A+                   | 33%              | 24%                    | 29%                | 27%            |
| A-                   | 7%               | 2%                     | 2%                 | 0.5%           |
| B+                   | 9%               | 18%                    | 9%                 | 25%            |
| B-                   | 2%               | 1%                     | 1%                 | 0.4%           |
| AB+                  | 3%               | 4%                     | 2%                 | 7%             |
| AB-                  | 1%               | 0.3%                   | 0.2%               | 0.1%           |



**Εικόνα 11:** Ποσοστό εμφάνισης των ομάδων αίματος του ABO συστήματος παγκοσμίως. [27]

### 1.3.1 Κατανομή των αντιγόνων ABO στην Ελλάδα.

- Στην ελληνική καθώς και στην υπόλοιπη Ευρωπαϊκή φυλή, οι ομάδες, κατά το σύστημα ABO, που βρίσκονται σε μεγάλη αναλογία είναι οι A και O. Σε λαούς άλλων φυλών, όπως οι Ινδοί καθώς και σε νομαδικές φυλές που ζούν στην Ευρώπη, η αναλογία αυτή αλλάζει και πλειοψηφούν άλλες ομάδες (B, AB). [16]Όσον αφορά τον Ελλαδικό γεωγραφικό χώρο, η πληθυσμιακή κατανομή των αντιγόνων του συστήματος ABO περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 2:** Ποσοστά εμφάνισης των ομάδων αίματος του ABO συστήματος στον Ελληνικό πληθυσμό.[16]

| Γονότυπος                                                                             | Φαινότυπος                           | Αντιγόνα                                 | Συχνότητα % | Αντισώματα                              |
|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------|-------------|-----------------------------------------|
| A <sup>1</sup> /A <sup>1</sup><br>A <sup>1</sup> /A <sup>2</sup><br>A <sup>1</sup> /O | A <sup>1</sup>                       | A <sup>1</sup>                           | 32          | Αντι-B                                  |
| A <sup>2</sup> /A <sup>2</sup><br>A <sup>2</sup> /O                                   | A <sup>2</sup>                       | A <sup>2</sup> , H                       | 8           | Αντι-B<br>Αντι-A <sup>1</sup> 3%        |
| B/B<br>B/O                                                                            | B                                    | B                                        | 14          | Αντι-A <sup>1</sup>                     |
| A <sup>1</sup> /B<br>A <sup>2</sup> /B                                                | A <sup>1</sup> B<br>A <sup>2</sup> B | A <sup>1</sup> , B<br>A <sup>2</sup> , B | 5           | Κανένα<br>Αντι-A <sup>1</sup> 25%       |
| O/O                                                                                   | O                                    | H                                        | 41          | Αντι-A<br>Αντι-B                        |
| h/h                                                                                   | Bombay                               | Κανένα                                   |             | Αντι-H<br>Αντι-A <sup>1</sup><br>Αντι-B |

Σήμερα είναι αναγνωρισμένα 308 αντιγόνα. Από αυτά τα 270 έχουν ταξινομηθεί σε 30 διακεκριμένα αντιγονικά συστήματα από την ομάδα ISBT (International Society of Blood Transfusion) η οποία είναι υπεύθυνη για τον καθορισμό των επιφανειακών αντιγόνων των ερυθρών. Κάθε σύστημα αποτελείται από 1 έως 50 αντιγόνα τα οποία ελέγχονται είτε από ένα μεμονωμένο γονίδιο, είτε από σύμπλεγμα δύο ή περισσότερων ομολόγων γονιδίων. 38 αντιγόνα δεν έχουν τυποποιηθεί σε κάποιο σύστημα.[28]

**Πίνακας 3 :** Ανθρώπινα αντιγονικά συστήματα των ομάδων αίματος.[28]

| Number | Name                 | Symbol | Number of antigens | ISBT gene name | BUGO <sup>a</sup> gene name (s) | Chromosome | CD number |
|--------|----------------------|--------|--------------------|----------------|---------------------------------|------------|-----------|
| 001    | ABO                  | ABO    | 4                  | ABO            | ABO                             | 9          |           |
| 002    | MNS                  | MNS    | 46                 | MNS            | GYPA, GYPB, GYPE                | 4          | CD235a/b  |
| 003    | P                    | PI     | 1                  | PI             | PI                              | 22         |           |
| 004    | Rh                   | RH     | 50                 | RN             | RHD, RHCE                       | 1          | CD2400/CE |
| 005    | Lutheran             | LU     | 19                 | LU             | BCAM                            | 19         | CD239     |
| 006    | Kell                 | KEL    | 31                 | KEL            | KEL                             | 7          | CD238     |
| 007    | Lewis                | LE     | 6                  | LE             | FUT3                            | 19         |           |
| 008    | Duffy                | FY     | 6                  | FY             | DARC                            | 1          | CD234     |
| 009    | Kidd                 | JK     | 3                  | JK             | SLC14A1                         | 18         |           |
| 010    | Diego                | DI     | 21                 | DI             | SLC4A1                          | 17         | CD233     |
| 011    | Yt                   | YT     | 2                  | YT             | ACHE                            | 7          |           |
| 012    | Xg                   | XG     | 2                  | XG             | XG, CD99                        | X/Y        | CD99      |
| 013    | Scianna              | SC     | 7                  | SC             | ERMAP                           | 1          |           |
| 014    | Dombrock             | DO     | 6                  | DO             | ART4                            | 12         | CD297     |
| 015    | Colton               | CO     | 3                  | CO             | AQP1                            | 7          |           |
| 016    | Landsteiner – Wiener | LW     | 3                  | LW             | ICAM4                           | 19         | CD242     |
| 017    | Chido – Rodgers      | CH/RG  | 9                  | CH/RG          | C4A, C4B                        | 6          |           |
| 018    | H                    | H      | 1                  | H              | FUT1                            | 19         |           |
| 019    | Kx                   | XK     | 1                  | XK             | XK                              | X          |           |
| 020    | Gerbich              | GE     | 8                  | GE             | GYPC                            | 2          | CD236     |
| 021    | Cromer               | CROM   | 15                 | CROM           | CD66                            | 1          | CD55      |
| 022    | Knops                | KN     | 9                  | KN             | CR1                             | 1          | CD35      |
| 023    | Indian               | IN     | 4                  | IN             | CD44                            | 11         | CD44      |
| 024    | OK                   | OK     | 1                  | OK             | BSG                             | 19         | CD147     |
| 025    | Raph                 | RAPH   | 1                  | RAPH           | CD151                           | 11         | CD151     |
| 026    | John Milton Hagen    | JMH    | 5                  | JMH            | SEMA7A                          | 15         | CD108     |
| 027    | I                    | I      | 1                  | I              | GCNT2                           | 6          |           |
| 028    | Globoside            | GLOB   | 1                  | GLOB           | B2GALT3                         | 3          |           |
| 029    | Gil                  | GIL    | 1                  | GIL            | AQP3                            | 9          |           |
| 030    | RHAG                 | RHAG   | 3                  | RHAG           | RHAG                            | 6          | CD241     |

### **1.3.2. Κατανομή σπάνιων αντιγόνων:**

Ενενήντα οκτώ τοις εκατό των ανθρώπων που πάσχουν από δρεπανοκυτταρική αναιμία είναι Αφρο-Αμερικανοί. Αυτοί οι άνθρωποι - οι περισσότεροι από τους οποίους είναι παιδιά - πρέπει να υποβάλλονται σε τακτικές μεταγγίσεις αίματος. Συχνά, αναπτύσσουν αντισώματα από το αίμα που λαμβάνουν, οδηγώντας σε δυνητικά απειλητικές για τη ζωή αντιδράσεις μετάγγισης. Αλλά αν μπορούν να λάβουν αίμα από άτομο που είναι πιο κοντά στη δική τους καταγωγή, ο κίνδυνος ελαχιστοποιείται. Και οι καλύτερες συμβατότητες βρίσκονται μεταξύ άλλων Αφρο-Αμερικανών.[29]

Ακολουθεί ένα διάγραμμα των σπάνιων αντιγόνων του αίματος και οι πιθανότητες να βρεθούν αυτά τα σπάνια αντιγόνα στις χώρες της Αφρικής, της Αμερικής και των Καυκάσιων.

**Πίνακας 4:** Μελέτη του 2015. Κέντρο Αίματος του Ειρηνικού.[29]

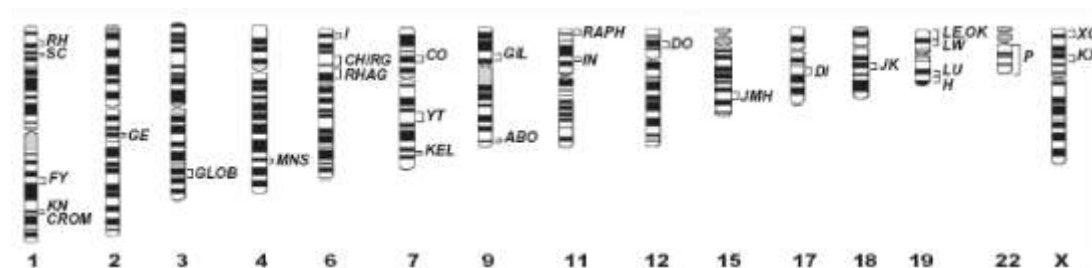
| <b>Σπάνιο αντιγόνο</b> | <b>Πιθανότητα ύπαρξης σπάνιου αντιγόνου</b> |                                   |
|------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------|
|                        | Σε Καυκάσιο πληθυσμό                        | Σε Αφρο-αμερικάνικο πληθυσμό      |
| U                      | Δεν βρέθηκε                                 | 1 στους 250                       |
| Js(b)                  | Δεν βρέθηκε                                 | 1 στους 319                       |
| Cr(a)                  | Δεν βρέθηκε                                 | 1 στους 6,429                     |
| At(a)                  | Δεν βρέθηκε                                 | 1 στους 16,400                    |
| Rh17                   | Δεν βρέθηκε                                 | Δεν έχει καθιερωθεί (πολύ σπάνιο) |
| Jk(b)                  | 2 στους 10                                  | 5 στους 10                        |
| Fy(a)                  | 3 στους 10                                  | 9 στους 10                        |
| Fy(b)                  | 1 στους 10                                  | 8 στους 10                        |

### **1.4 Γενετική ανάλυση των ABO ομάδων αίματος:**

Κατά τη γέννηση ενός ατόμου, τα αντιγόνα του συστήματος ABO δεν έχουν αναπτυχθεί εντελώς. Αναπτύσσονται μέχρι το 2<sup>ο</sup>-4<sup>ο</sup> έτος κατά το οποίο συμπληρώνεται η ανάπτυξή τους και έκτοτε παραμένουν σταθερά για όλη την υπόλοιπη ζωή. Το 1924, ο Felix Bernstein προέβλεψε από εκτεταμένες οικογενειακές μελέτες ότι ο μηχανισμός κληρονομικότητας περιλαμβάνει 3 αλληλόμορφα στο σύστημα ABO[30] που εδράζονται στο μακρό σκέλος του χρωμοσώματος 9 [21, 31-

33], θέση 9q34.1. Δεν κωδικοποιούν για A και B αντιγόνα. Κωδικοποιούν, όπως αναφέραμε προηγουμένως, για ένζυμα τρανσφεράσες που καταλύουν την προσθήκη μονοσακχαριτών σε ολιγοσακχαριδικές αλυσίδες.

Οι Yamamoto, et al. κλωνοποίησαν και καθόρισαν τις δομές τους. Έκαναν γενετική ανάλυση των αντιγόνων του ABO συστήματος χρησιμοποιώντας τεχνικές μοριακής βιολογίας.[31, 32, 34-41] Τα γονίδια αυτά αποτελούνται από 7 εξόνια κατανεμημένα σε 18kb γενωμικού DNA. Το εξόνιο 7 περιέχει το μεγαλύτερο μέρος της κωδικοποιούμενης αλληλουχίας. Το εξόνιο 6 περιέχει τις διαγραφές που βρέθηκαν στα περισσότερα O αλληλόμορφα. Τα εξόνια κυμαίνονται σε μέγεθος από 28 με 691 bp.[25] Όμως υπάρχουν άλλα δύο αλληλόμορφα ζεύγη γονιδίων που ρυθμίζουν την παραγωγή και την έκφραση των αντιγόνων του ABO συστήματος και επίσης εδράζονται στα μακρά σκέλη του χρωμοσώματος 9.

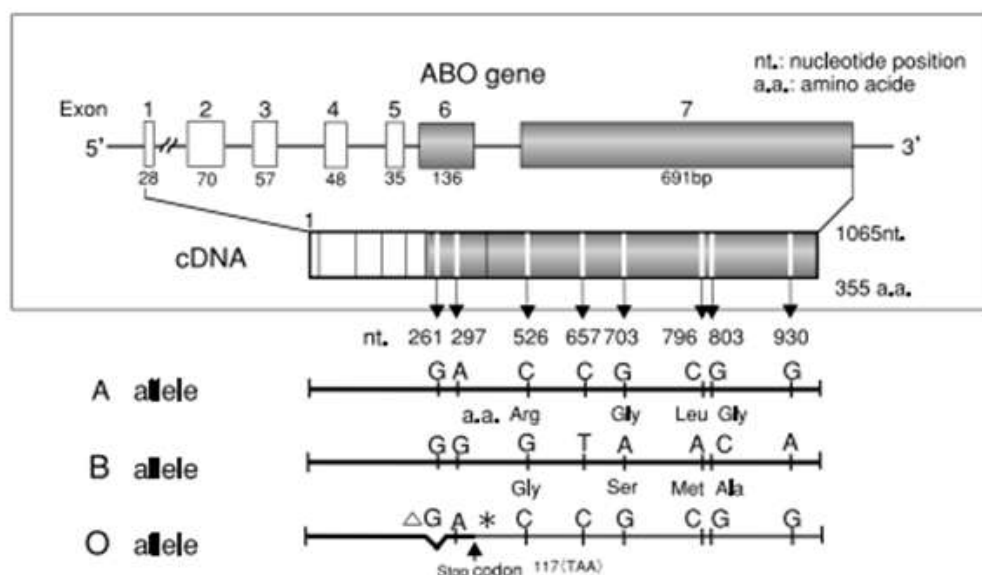


**Εικόνα 12:** Τα συστήματα των ομάδων αίματος και η θέση τους πάνω στα χρωμοσώματα. Η τοποθεσία των γονιδίων που κωδικοποιούν τις ομάδες αίματος απεικονίζεται σε αυτά τα 15 χρωμοσώματα.[42]

Συνολικά λοιπόν είναι τρία τα αλληλόμορφα ζεύγη, δηλαδή:

- 1) Το ζευγάρι H/h, με το γόνο H επικρατή και το γόνο h υπολειπόμενο.
  - 2) Το ζευγάρι ABO, με τους γόνους A και B επικρατείς και το γόνο O υπολειπόμενο και.
  - 3) Το ζευγάρι Se/se. με το γόνο Se επικρατή και το γόνο se υπολειπόμενο.
- Όταν ο γονότυπος έχει τη σύσταση H/H ή H/h, τότε εξασφαλίζεται η σύνθεση του αντιγόνου H, που αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την παραγωγή των αντιγόνων A και B αφού είναι ο βιοχημικός σκελετός τους.[16]
- Αναφορικά με το δεύτερο αλληλόμορφο ζεύγος των γόνων ABO, έχει τρεις κύριες μορφές αλληλομόρφων, A, B και O. Τα A και B αλληλόμορφα

κωδικοποιούν 354 αμινοξέα μακρών πρωτεϊνών, οι οποίες προβλέπονται ότι είναι τύπου II διαμεμβρανικές γλυκοζυλοτρανσφεράσες που αποτελούνται από μια βραχύ N-τερματική περιοχή, μια υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή, και μία μακριά C-τερματική καταλυτική περιοχή.[40] Τα A και B αλληλόμορφα έχουν 7 νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις (297A>G, 526C>G, 657C>T, 703G>A, 796C>A, 803G>C και 930G>A). Τέσσερις από τις νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις (526C>G, 703G>A, 796C>A και 803G>C) μεταφράζονται σε διαφορετικές υποκαταστάσεις αμινοξέων (Arg526Gly, Gly703Ser, Leu796Met και Gly803Ala). Αυτές οι υποκαταστάσεις καθορίζουν την ειδικότητα των γλυκοζυλοτρανσφερασών. Το A αλληλόμορφο κωδικοποιεί την A τρανσφεράση η οποία καταλύει την προσθήκη του GalNAc καταλοίπου, και το B αλληλόμορφο κωδικοποιεί την B τρανσφεράση η οποία καταλύει την προσθήκη του Gal καταλοίπου, αντίστοιχα, σε έναν α1→3 δεσμό στην τερματική Gal του H αντιγόνου. Από την άλλη πλευρά, το O αλληλόμορφο διαφέρει από το A αλληλόμορφο για μία διαγραφή νουκλεοτιδίου, της γουανίνης G στη θέση 261. Αυτή η διαγραφή οδηγεί σε ένα διαφορετικό πλαίσιο ανάγνωσης που δημιουργεί μια διαφορετική αμινοξική αλληλουχία και ένα κωδικόνιο λήξης στη θέση 118 και έτσι το O αλληλόμορφο κωδικοποιεί μία καταλυτικά ανενεργό τρανσφεράση (εικόνα 13). [25, 32, 35]



**Εικόνα 13:** Δομή της περιοχής του ABO γονιδίου και της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των A, B και O αλληλομόρφων. Σχεδιάγραμμα της οργάνωσης των εξονίων της κωδικοποιούσας πρωτεϊνικής αλληλουχίας (άνω γκριζα περιοχή). Τελείως διαφορετική αμινοξική αλληλουχία

προκύπτει στο O αλληλόμορφο λόγω της αλλαγής του πλαισίου ανάγνωσης που προκαλείται από την έλλειψη μίας βάσης (κάτω γκριζα περιοχή). [12]

Σύμφωνα με όλα αυτά, οι ομάδες κατά ABO εμφανίζουν τους εξής γονότυπους:

- 1) Ομάδα A: γόνοι A/A ή A/O και H/H ή H/h
- 2) Ομάδα B: γόνοι B/B ή B/O και H/H ή H/h
- 3) Ομάδα AB: γόνοι A/B και H/H ή H/h
- 4) Ομάδα O: γόνοι O/O και H/H ή H/h

- Το τρίτο αλληλόμορφο ζεύγος αφορά τους εκκριτικούς γόνους. Αυτοί είναι οι Se (επικρατής γόνος) και se (υπολειπόμενος γόνος). Απο τη δράση τους οφείλεται αν τα αντιγόνα της ομάδας ABO θα περιέχονται στα υγρά που εκκρίνουν οι αδένες ενός ανθρώπου (π.χ σίελο κ.λ.π). ο γόνος Se είναι υπεύθυνος για την παρουσία των αντιγόνων ABO στις εκκρίσεις. Απεναντίας ο γόνος se δεν ευθύνεται για την παρουσία τους στις εκκρίσεις. Όταν έχουμε γονότυπο Se/Se ή Se/se, τα άτομα είναι εκκριτικού τύπου. Στην περίπτωση όμως που πρόκειται για γονότυπο se/se, τα άτομα είναι μη εκκριτικού τύπου, εκκρίνονται κάποιες γλυκοπρωτείνες που στερούνται της αντιγονικής δράσης των H, A και B. Το 80% του πληθυσμού ανήκει στον εκκριτικό τύπο και το 20% στο μη εκκριτικό.[16]
- Στην πολύ σπάνια περίπτωση, που το άτομο είναι ομόζυγο στον υπολειπόμενο γόνο h/h, τότε δεν παράγεται αντιγόνο H. Έτσι, μολονότι παράγονται σε ικανοποιητικά επίπεδα τα συστατικά για τη δημιουργία των A και B αντιγόνων, αυτά ουσιαστικά είναι ανίκανα να συναρμολογηθούν αφού δεν υπάρχει αντιγόνο H, που αποτελεί τον κορμό των υπόλοιπων. Η ομάδα αυτή λέγεται «φαινότυπος Oh» ή «ομάδα Bombay» γιατί πρώτο ανακαλύφθηκε στην Ινδία που συναντώνται και τα περισσότερα περιστατικά. Ο ορός ανθρώπου με ομάδα Bombay περιέχει αντισώματα αντι-A, αντι-B και αντι-H, προκαλώντας συγκολλήσεις με όλα τα ερυθρά του συστήματος ABO. Ασθενής τέτοιας ομάδας μπορεί να λάβει μετάγγιση με αίμα μόνο της ίδιας ομάδας. Ευτυχώς είναι πολύ σπάνια και στον Ελλαδικό χώρο σχεδόν ανύπαρκτη. [16]

## **1.5 Υποομάδες:**

### **1.5.1. Υποομάδες των Α και Β αντιγόνων:**

Ένας υπότυπος των ABO ομάδων αίματος καλείται υποομάδα και/ή παραλλαγή. Οι υποομάδες των ABO διακρίνονται από μειωμένες ποσότητες των Α, Β ή Ο (Η) αντιγόνων στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων. Οι πιο κοινές είναι οι υποομάδες Α και Β. Η ομάδα αίματος Α φαίνεται να έχει τις περισσότερες παραλλαγές σε υποομάδες. Η ομάδα αίματος Α με μία φυσιολογική ποσότητα αντιγόνων, ονομάζεται  $A^1$ , και διαχωρίζεται από τις υποομάδες.

Οι υποομάδες ταξινομούνται από την ποσότητα των Α αντιγόνων, και η ποσότητα του Α αντιγόνου μειώνεται με τη σειρά  $A_1, A_2, A_3, A_x, A_{end}, A_m, A_{el}$ . Στην Ευρώπη, περίπου το 80% των ομάδων αίματος Α και ΑΒ ανήκουν στον τύπο  $A_1$ , το υπόλοιπο 20% είναι είτε  $A^2$  ή  $A^2B$  (στην Ιαπωνία είναι περίπου 0,2%) [43, 44]. Σε γενικές γραμμές, η ορολογική διάκριση μεταξύ  $A^1$  και  $A^2$  βασίζεται στην συγκόλληση των  $A_1$  ερυθρών αιμοσφαιρίων αλλά όχι των  $A_2$  κυττάρων με την αντι- $A^1$  λεκτίνη ( εκχύλισμα σπόρων *Dolichos biflorus*)[45]. Η αλληλουχία του  $A^2$  αλληλόμορφου που κωδικοποιεί την ομάδα αίματος  $A^2$ , ύστερα απο μοριακή γενετική ανάλυση, φαίνεται να έχει μια ενιαία έλλειψη βάσης κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο. Η έλλειψη αυτή, προκαλεί αλλαγή στο πλαίσιο ανάγνωσης και καταλήγει στην απώλεια της δραστηριότητας της  $A^2$  τρανσφεράσης. Η έλλειψη αυτή του  $A^2$  αλληλόμορφου κατέστησε δυνατή την γενετική ανάλυση της ομάδας αίματος  $A^2$ [46]. Παρόμοια, υποομάδες της ομάδας αίματος Β ταξινομούνται με βάση την ποσότητα του Β αντιγόνου, και την ποσότητα του Β αντιγόνου που μειώνεται με τη σειρά Β,  $B_3$ ,  $B_x$ ,  $B_m$ ,  $B_{el}$ . Η έκφραση των Α και Β αντιγόνων συνοψίζεται στον πίνακα 5 [47, 48].

**Πίνακας 5:** Έκφραση των ABO αντιγόνων ανα μονάδα επιφάνειας ερυθροκυττάρου.

| Ομάδες τύπου Αιματος |            | Έκφραση           |
|----------------------|------------|-------------------|
| A <sub>1</sub>       | ενήλικας   | 810,000           |
|                      |            | ~1,170,000        |
| A <sub>1</sub>       | νεογέννητο | 250,000 ~ 370,000 |
| A <sub>2</sub>       | ενήλικας   | 240,000 ~ 290,000 |
| A <sub>2</sub>       | νεογέννητο | 140,000           |
| A <sub>1</sub> B     | ενήλικας   | 460,000 ~ 850,000 |
| A <sub>1</sub> B     | νεογέννητο | 240,000 ~ 290,000 |
| A <sub>2</sub> B     | ενήλικας   | 120,000           |
| A <sub>3</sub>       |            | 7,000 ~ 100,000   |
| A <sub>x</sub>       |            | 1,400 ~ 10,000    |
| A <sub>end</sub>     |            | 1,100 ~ 4,400     |
| A <sub>m</sub>       |            | 200 ~ 1,900       |
| A <sub>el</sub>      |            | 100 ~ 1,400       |
| B                    |            |                   |
| B                    | ενήλικας   | 610,000 ~ 830,000 |
|                      | νεογέννητο | 200,000 ~ 320,000 |
| A <sub>1</sub> B     | ενήλικας   | 310,000 ~ 560,000 |

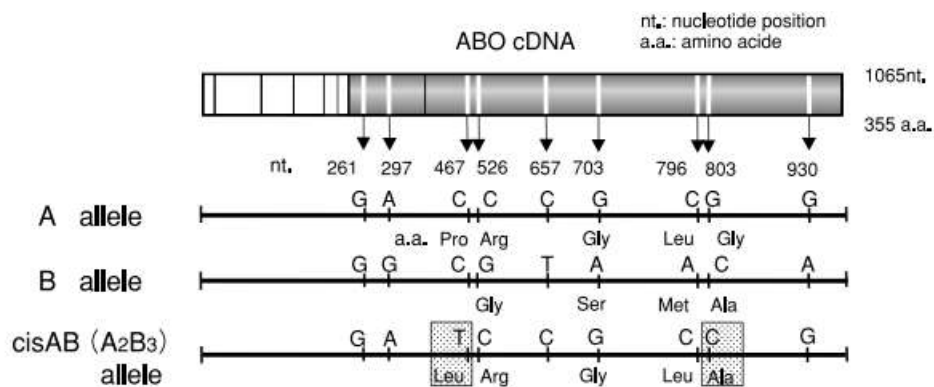
### **1.5.2. Υποομάδες της AB:**

Η ομάδα αίματος AB ταξινομείται σε εννιά υποομάδες ( $A^x B$ ,  $A^1 B^x$ ,  $A^m B$ ,  $A^1 B^m$ ,  $A^l B$ ,  $A^1 B^l$ ,  $cis A^2 B^3$ ,  $cis A^2 B$ ,  $cis A^1 B^3$ ) με βάση την ποσότητα των A και B αντιγόνων. Ιδίως η  $cis AB$  υποομάδα, είναι ένας πολύ σπάνιος φαινότυπος και έχει τρεις τύπους αίματος,  $cis A^2 B^3$  ( $A^2 B^3/O$ ),  $cis A^2 B$  ( $A^2 B^3/B$ ),  $cis A^1 B^3$  ( $A^2 B^3/A^1$ ). Ανιχνεύοντας την παραλλαγή αυτή στην AB ομάδα είναι πολύ σημαντικό, ειδικά κατά τις μεταγγίσεις αίματος και στη διαλεύκανση του προβλήματος της πατρότητας στο ABO σύστημα ομάδων αίματος.

Το 1964, οι Seyfried, et al. αναφέρθηκαν σε μια οικογένεια που αποτελείται από μια γυναίκα με ομάδα αίματος AB, ο άντρας της με O, και η κόρη τους με AB. Περιέγραψαν αυτή τη περίεργη κληρονομικότητα της ομάδας αίματος A και B και πρότειναν ότι αυτές οι ιδιαιτερότητες μπορεί να κωδικοποιούνται από γονίδια που εδράζονται στο ίδιο γονίδιο[49]. Το 1966, οι Yamaguchi, et al. αναφέρθηκαν σε μια οικογένεια που αποτελείται από τρία παιδιά με ομάδα αίματος  $A^2 B^3$  γεννημένα από ένα πατέρα ομάδας αίματος O και μια μητέρα ομάδας αίματος  $A^2 B^3$ . Αυτή η οικογένεια ζούσε στο νομό Tokushima στην Ιαπωνία. Αυτό το εύρημα δείχνει ότι τα A και B γονίδια εντοπίστηκαν στο ίδιο χρωμόσωμα. Πρότειναν το όνομα “CisAB” για να το διαχωρήσουν από το συνηθισμένο AB, που ονομάζεται “Trans AB” [50].

Έχει αναφερθεί ότι η συχνότητα αυτού του φαινότυπου είναι προφανώς υψηλότερη στους νομούς Tokushima, Ishikawa και Kagawa από ότι σε άλλους νομούς της Ιαπωνίας. Για παράδειγμα, η συχνότητα του cisAB φαινότυπου στον νομό Tokushima (0.017%-0.02%) είναι περίπου 11 φορές τόσο υψηλή όσο εκείνη του νομού Osaka (0.0014%-0.0017%) [51, 52]. Επιπλέον, είναι ενδιαφέρον ότι κάποιες cisAB οικογένειες σε άλλους νομούς είχαν στην πραγματικότητα μεταφερθεί από την Tokushima κατά τη διάρκεια των τελευταίων αρκετών γενεών. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι οι οικογένειες με cisAB φαινότυπο μπορεί να έχουν κοινούς προγόνους.

Πρόσφατα, προσδιορίστηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία της κωδικοποιούμενης περιοχής στα δύο τελευταία εξόνια των ABO γονιδίων από cisAB άτομα. CisAB ( $A^2B^3$ ) αλληλόμορφα ήταν ταυτόσημα το ένα με το άλλο ενώ διέφεραν από το  $A^1$  αλληλόμορφο κατά δύο νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις (Εικ.14). Και οι δύο από αυτές τις νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις έχουν ως αποτέλεσμα αντικατάσταση του αντίστοιχου αμινοξέως[53]. Η πρώτη αντικατάσταση είναι ταυτόσημη με αυτή που προηγουμένος βρέθηκε στο  $A^2$  αλληλόμορφο, αντίστοιχα και στο cisAB ( $A^2B^3$ ) αλληλόμορφο που κωδικοποιεί μια γλυκοζυλτρανσφεράση που είναι ικανή να συνθέσει και τα δύο A και B αντιγόνα [40, 41, 46]. Ως εκ τούτου, οι φαινότυποι του ABO συστήματος ομάδας αίματος, όπως είναι οι υποομάδες A, B και AB, έχουν πραγματοποιηθεί από αλλαγές στην αλληλουχία του cDNA, για παράδειγμα, αντικαταστάσεις βάσεων ή ελλείψεις. Σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των αλληλομόρφων των A, B και AB υποομάδων συνοψίζεται στον πίνακα 6 [25, 54, 55].



**Εικόνα 14:** Δομή της περιοχής του ABO γονιδίου και των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των A, B και cisAB αλληλομόρφων. Διάγραμμα της οργάνωσης των εξονίων της κωδικοποιούμενης πρωτεϊνικής αλληλουχίας (άνω γκρι περιοχή) [12].

**Πίνακας 6:** Σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των αλληλομόρφων των A, B και AB υποομάδων. (Vox Sang, 1995, Yamamoto et al.)

| Συνολική κωδική ακολουθία ορισμένη ως προς το cDNA |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |               |
|----------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|---------------|
|                                                    | 261 | 297 | 467 | 526 | 646 | 657 | 703 | 796 | 802 | 803 | 871 | 930 | 1054 | 1059·1061 nt. |
| A <sub>1</sub> αλληλόμορφο                         | G   | A   | C   | C   | T   | C   | G   | C   | G   | G   | G   | G   | C    | C             |
| A <sub>2</sub> αλληλόμορφο                         |     |     | T   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      | C·del         |
| A <sub>3</sub> αλληλόμορφο                         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | A   |     |      |               |
| A <sub>x</sub> αλληλόμορφο                         |     |     |     |     | A   |     |     |     |     |     |     |     |      |               |
| B αλληλόμορφο                                      |     | G   |     | G   |     | Tα  | A   | A   |     | C   |     | A   |      |               |
| B <sub>3</sub> αλληλόμορφο                         |     |     |     |     |     |     |     |     |     | C   |     | A   | Tα   |               |
| cis AB αλληλόμορφο                                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     | C   |     |     |      |               |

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΕΘΟΔΟΙ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **2.1 Αναλυτική περιγραφή των μοριακών μεθόδων που χρησιμοποιούνται σε αυτές τις γονιδιακές μελέτες του συστήματος ABO ομάδας αίματος:**

Η τεχνολογία της γενετικής χρησιμοποιώντας τη τεχνική της PCR έχει αξιοσημείωτα αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια και χρησιμοποιείται ευρέως στα κλινικά εργαστήρια. Αναλόγως, οι γονότυποι της ABO ομάδας αίματος έχουν αναλυθεί χρησιμοποιώντας την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης-περιορισμένου μήκους θραύσματος πολυμορφισμού (PCR-RFLP, restriction fragment length polymorphism), PCR-άμεσης αλληλούχισης (PCR-direct sequencing), PCR-διαμόρφωση μονόκλωνου πολυμορφισμού (PCR-SSCP, single strand conformation polymorphism), PCR- ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλομόρφων (PASA, PCR-amplification of specific alleles) και πραγματικού χρόνου PCR μέσω ανάλυσης των καμπύλων τήξεως (real time PCR, melting curve analysis)

#### **1) PCR, (polymerase chain reaction) αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης**

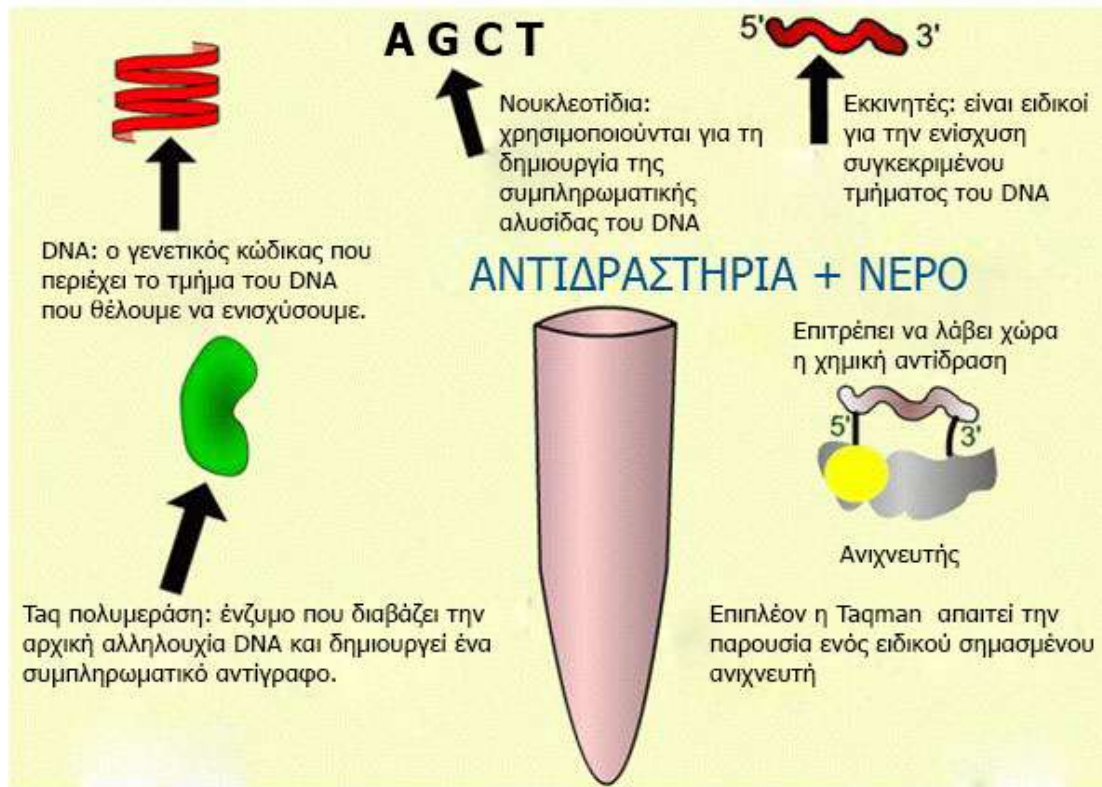
Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, polymerase chain reaction), επιτρέπει τον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό αλληλουχιών DNA από ένα μείγμα. Αρκετά πρόσφατα, η δυνατότητα απομόνωσης καθαρών DNA πολυμερασών καθώς και χημικά συντιθέμενων ολιγονουκλεοτιδίων, σε μεγάλες ποσότητες, επέτρεψε την «κλωνοποίηση» συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανού κυττάρου: η μέθοδος PCR μας επιτρέπει να αντιγράψουμε εκατομμύρια φορές ειδικά τμήματα από ένα σύνθετο μείγμα DNA. Η εκλεκτική αντιγραφή σπάνιων αλληλουχιών που υπάρχουν σε ένα μείγμα DNA, έχει αυξήσει πάρα πολύ την ευαισθησία των γενετικών αναλύσεων και έχει πολλές εφαρμογές. Βραβείο Νόμπελ Χημείας δόθηκε το 1993 στους ερευνητές Kary Mullis και Michael Smith για την ανακάλυψη αυτής της μοριακής μεθόδου.[56]

Προυπόθεση για να εφαρμόσουμε τη μέθοδο PCR, είναι να γνωρίζουμε μέρος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του τμήματος DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Η γνωστή αλληλουχία χρησιμοποιείται για το σχεδιασμό δύο συνθετικών

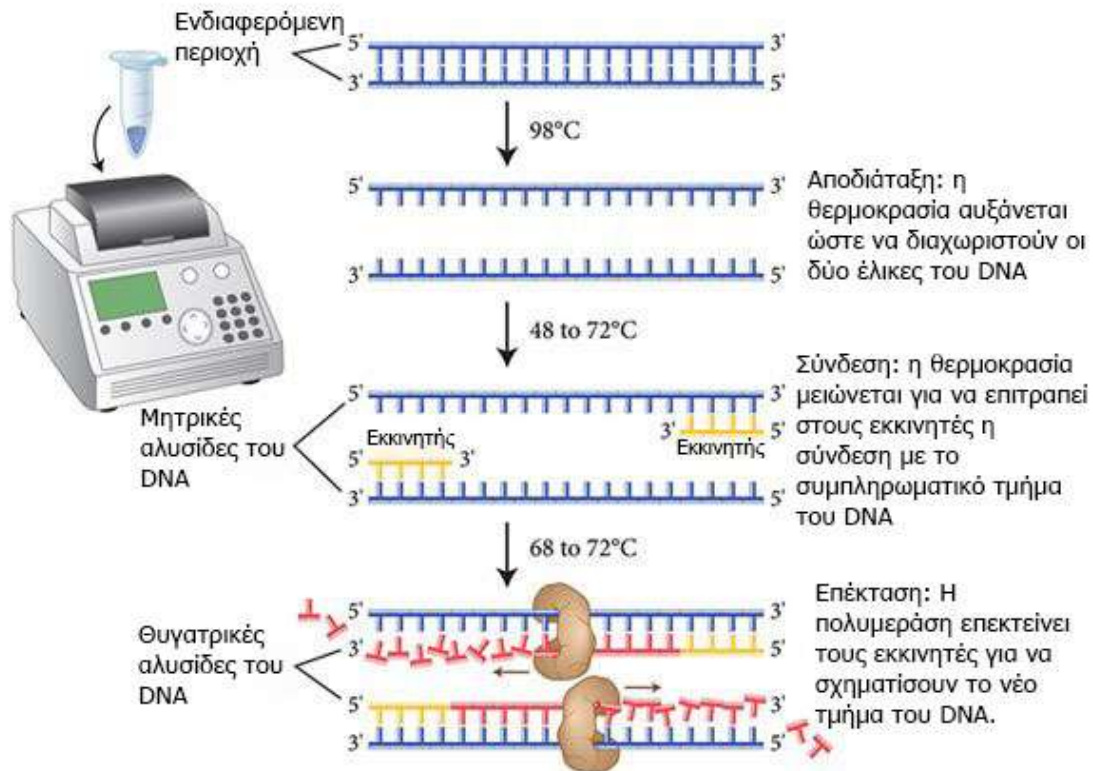
ολιγονουκλεοτιδίων, ενός συμπληρωματικού προς το 5' άκρο της μια αλυσίδας του κομματιού DNA και ενός συμπληρωματικού προς το 3' άκρο της άλλης αλυσίδας. Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά χρησιμεύουν ως πρωταρχικά τμήματα (εκκινητές, primers) για in vitro σύνθεση DNA, που καλύπτεται από μία DNA πολυμεράση, και οριοθετούν τα άκρα του τελικού προϊόντος [57].

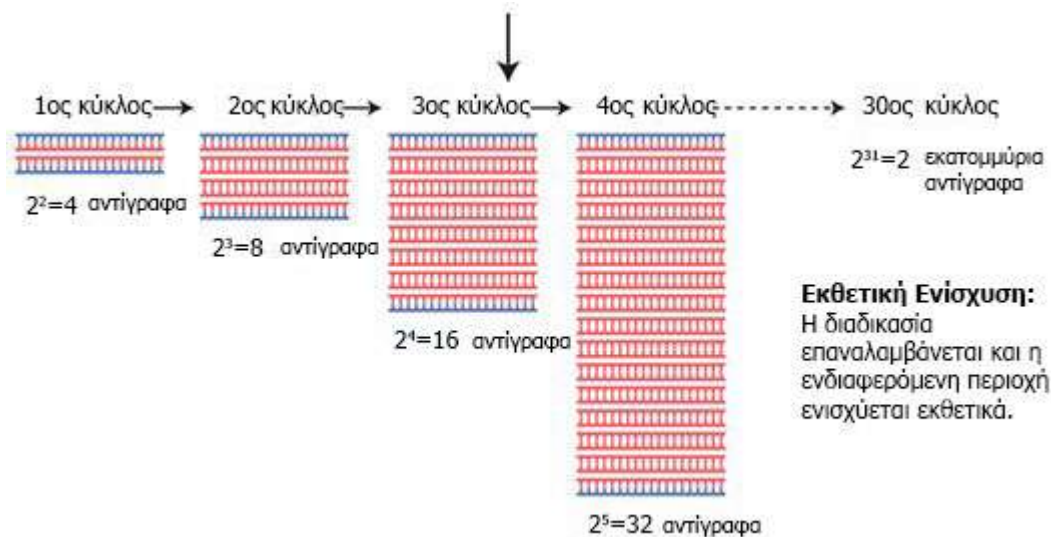
#### Αρχή της μεθόδου

Περίσσεια των ολιγονουκλεοτιδίων, προστίθεται στο αποδιαταγμένο DNA, σε θερμοκρασία 50 ως 60°C. Το συνολικό δείγμα του χρωμοσωμικού DNA, που βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση, παραμένει αποδιαταγμένο ενώ τα ειδικά ολιγονουκλεοτίδια υβριδοποιούνται στις σωστές θέσεις πάνω στο DNA. Οι υβριδοποιημένοι αυτοί ανιχνευτές χρησιμεύουν στη συνέχεια ως πρωταρχικά τμήματα για τη σύνθεση DNA, η οποία αρχίζει όταν προσθέσουμε δεοξυνουκλεοτίδια και μία DNA πολυμεράση που είναι ανθεκτική στις υψηλές θερμοκρασίες (Taq πολυμεράση) απομονώνεται από το βακτήριο θερμών πηγών (*Thermus aquaticus*). Η Taq πολυμεράση μπορεί να επιμηκύνει τα πρωταρχικά τμήματα σε θερμοκρασία μέχρι 72°C. Όταν τελειώσει η σύνθεση, όλο το μείγμα θερμαίνεται στους 95°C ώστε να αποδιαταχθούν τα δίκλινα μόρια που έχουν μόλις συντεθεί. Όταν χαμηλώσουμε πάλι τη θερμοκρασία, μπορούμε να έχουμε ένα νέο κύκλο σύνθεσης, εφόσον τα ολιγονουκλεοτίδια βρίσκονται σε περίσσεια. Αυτός ο κύκλος σύνθεσης και αποδιάταξης μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές ώστε να συνθέσουμε μεγάλες ποσότητες της αλληλουχίας που μας ενδιαφέρει. Σε κάθε κύκλο διπλασιάζεται ο αριθμός των αντιγραφών που αντιστοιχούν στην αλληλουχία που βρίσκεται ανάμεσα στις θέσεις όπου υβριδοποιούνται τα δύο ολιγονουκλεοτίδια και έτσι η αλληλουχία που μας ενδιαφέρει πολλαπλασιάζεται εκθετικά [57].



**Εικόνα 15:** Αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην εφαρμογή της PCR μεθόδου.





**Εικόνα 16:** Σχηματική αναπαράσταση της αρχής λειτουργίας της PCR μεθόδου.

Η μέθοδος PCR είναι εξαιρετικά ευαίσθητη. Επιτρέπει τη γρήγορη ανάλυση ειδικών περιοχών DNA που περιέχονται σε ένα πολύ μικρό δείγμα. Ήδη χρησιμοποιείται ως διαγνωστική μέθοδος στη γενετική του ανθρώπου, αντί της μεθόδου Southern, για ανίχνευση γενετικών ασθενειών και πρώτων σταδίων ιικών μολύνσεων (π.χ. έγκαιρη διάγνωση AIDS, πολύ βασική εξέταση στα εργαστήρια της Αιμοδοσίας), αλλά και στη δικανική επιστήμη όπου επιτρέπει την ανάλυση ελάχιστων ποσοτήτων αίματος ή άλλων ιστών και οδηγεί στην αναγνώριση του ατόμου από το οποίο προέρχονται από το γενετικό του αποτύπωμα. Στη βασική έρευνα αξίζει να αναφέρουμε τη χρησιμότητα της μεθόδου PCR στην απομόνωση και κλωνοποίηση σπάνιων γονιδίων [57].

## **2)RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism), μέθοδος του πολυμορφισμού του μήκους των θραυσμάτων DNA**

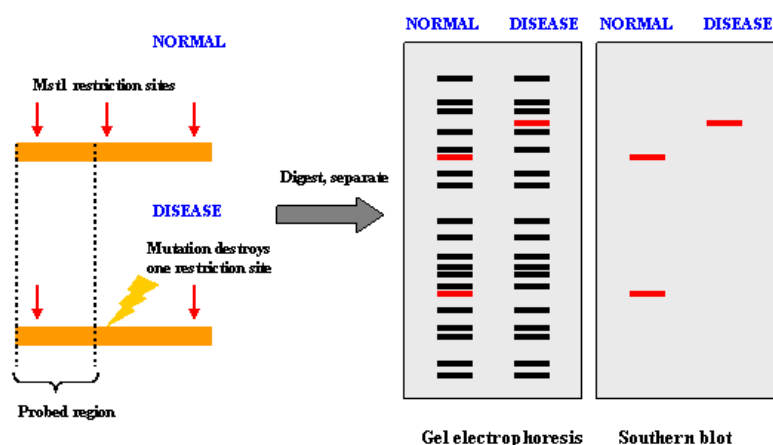
Η μέθοδος του πολυμορφισμού του μήκους των θραυσμάτων DNA μετά από πέψη με περιοριστικά ένζυμα, (restriction fragment length polymorphism, RFLP) αναφέρεται στην ποικιλομορφία που παρατηρείται σε ομόλογες αλληλουχίες DNA και εντοπίζεται με την παρουσία διαφορετικών μηκών τμημάτων DNA μετά την πέψη του με περιοριστικά ένζυμα. Η τεχνική αυτή εκμεταλλεύεται ότι SNPs και MNPs συχνά σχετίζονται με τη δημιουργία ή την κατάργηση μιας θέσης αναγνώρισης ενός περιοριστικού ενζύμου [58]. Το πρώτο βήμα σε μία ανάλυση PCR-RFLP είναι η

ενίσχυση του θραύσματος που περιέχει την παραλλαγή. Στη συνέχεια ακολουθείτε κατεργασία του ενισχυμένου θραύσματος με ένα κατάλληλο ένζυμο περιορισμού. Τα περιοριστικά ένζυμα (ή ενδονουκλεάσες) «κόβουν» το DNA στα σημεία που συναντούν ειδικές αλληλουχίες μήκους 5-6 βάσεων, που είναι γνωστές ως περιοριστικές θέσεις. Αυτά τα ένζυμα συναντώνται στα βακτήρια και ο ρόλος τους έγκειται στην προστασία αυτών από τους ιούς. Υπάρχει μία μεγάλη ποικιλία περιοριστικών ενζύμων, όπως το περιοριστικό ένζυμο EcoRI που κόβει όταν συναντά την αλληλουχία GAATTC παράγοντας ατελή άκρα και το SmaI που κόβει στη μέση όταν συναντά την αλληλουχία CCCGGG και παράγει τέλεια άκρα.

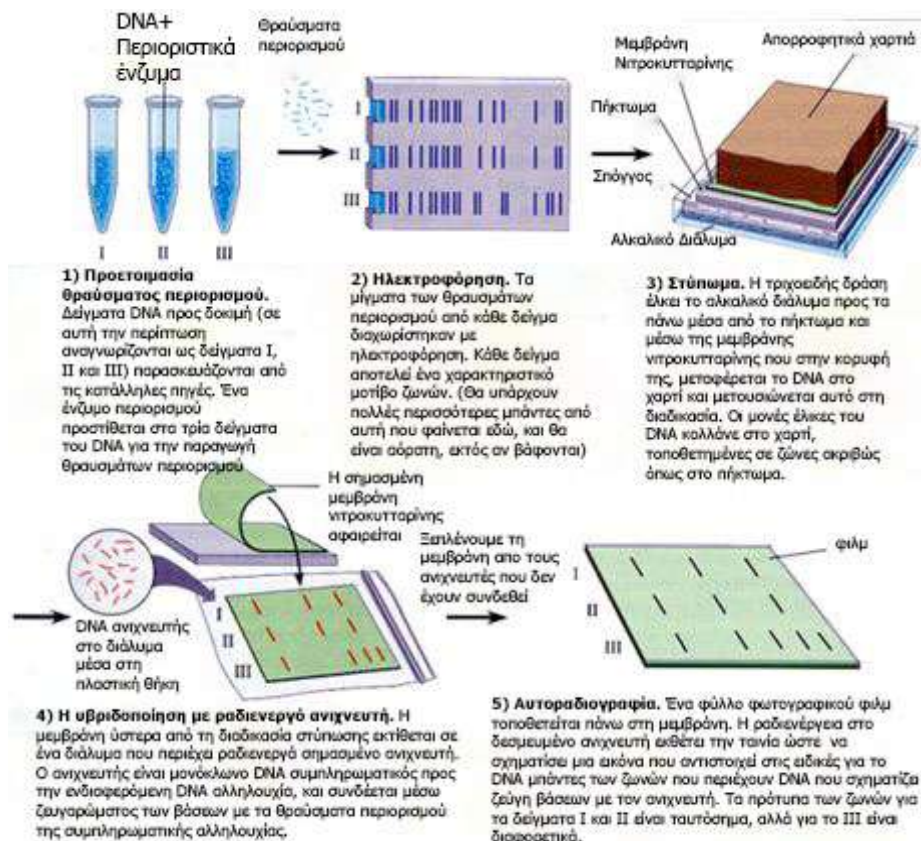


**Εικόνα 17:** Περιοριστικό ένζυμο EcoRI υποδεικνύεται που κόβει όταν συναντά την αλληλουχία GAATTC παράγοντας ατελή άκρα.

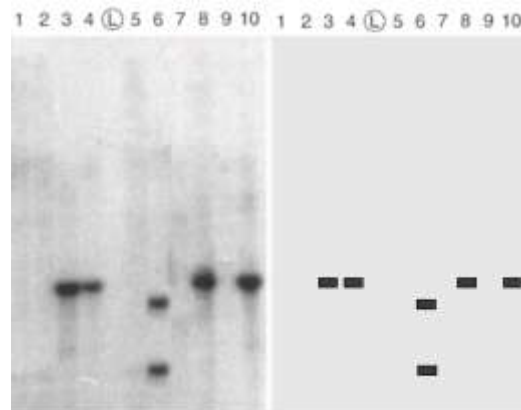
Μετά την πέψη του DNA με τα περιοριστικά ένζυμα, τα θραύσματα του DNA διαχωρίζονται βάσει τους μήκους τους σε πήκτωμα αγαρόζης με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης και στην συνέχεια μεταφέρονται σε μία μεμβράνη μέσω της διαδικασίας που είναι γνωστή ως Southern blot. Η υβριδοποίηση των θραυσμάτων της μεμβράνης σε σημασμένους ανιχνευτές (DNA probe) στη συνέχεια καθορίζει τα θραύσματα που είναι συμπληρωματικά των ανιχνευτών. Κάθε θραύσμα θεωρείται ως ένα αλληλόμορφο[57] (Εικ. 18,19,20).



**Εικόνα 18:** Πέψη με περιοριστικό ένζυμο MstI, ηλεκτροφόρηση και ανάλυση Southern.



**Εικόνα 19:** Η όλη διαδικασία ανάλυσης RFLP



**Εικόνα 20:** Η αυτοραδιογραφία Southern Blot δείχνει ότι μία DNA αλληλουχία ομόλογη της αλληλουχίας του ανιχνευτή που δημιουργήθηκε από το άτομο 10 είναι παρόν στα άτομα 3, 4 και 8 με αναμενόμενο μέγεθος 400bp, ενώ απουσιάζει από τα άτομα 1, 2, 5 και 9. Στο άτομο 6, η ομόλογη αλληλουχία είναι επίσης παρόν, αλλά ως δύο ζώνες (300bp η μία και 100bp η άλλη). Αυτό υποδεικνύει ότι η ομόλογη αλληλουχία υπάρχει σε αυτό το άτομο, αλλά έχει μία επιπλέον περιοριστική θέση που κόβει το θραύσμα σε 2 μικρότερα συνολικού μήκους 400bp. Συνεπώς το άτομο 6 δείχνει ένα πολυμορφισμό μήκους θραυσμάτων, υποδηλώνοντας μια ποικιλομορφία στην συγκεκριμένη αλληλουχία μεταξύ των ατόμων. Δεξιά είναι η σχηματική αναπαράσταση της αυτοραδιογραφίας.

Η ανάλυση RFLP αποτελεί μία βασική μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε στην γενετική ανάλυση του ABO συστήματος. Όπως και η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών έτσι και τα RFLPs έχουν ακόμα ενεργό ρόλο στην Μοριακή διάγνωση της ομάδας αίματος. Σημαντικά πλεονεκτήματα της τεχνικής PCR-RFLP περιλαμβάνουν λίγα έξοδα και έλλειψη απαίτησης για προηγμένα μέσα. Όμως η εφαρμογή τους έχει σε μεγάλο βαθμό αντικατασταθεί από νεότερες και πιο εξελιγμένες τεχνολογίες, εξαιτίας ορισμένων περιορισμών, όπως α) η μεγάλη ποσότητα DNA που απαιτούν, β) δεδομένου ότι η PCR-RFLP αποτελείται από διάφορα στάδια, συμπεριλαμβανομένου ενός ηλεκτροφορητικού σταδίου διαχωρισμού, είναι σχετικά χρονοβόρα, γ) η τεχνική δεν είναι κατάλληλη για την ταυτόχρονη ανάλυση ενός μεγάλου αριθμού διαφορετικών SNPs λόγω της απαίτησης για ένα συγκεκριμένο ζευγάρι εκκινητών και ένζυμο περιορισμού για κάθε SNP. Αυτό περιορίζει τη χρησιμότητά της για ανάλυση υψηλής απόδοσης, δ) η απαίτηση για ειδικές ενδονουκλεάσες και η ύπαρξη δυσκολιών στον προσδιορισμό της ακριβούς μεταβολής στην περίπτωση που πολλές SNPs επηρεάζουν την ίδια θέση αναγνώρισης περιοριστικού ενζύμου ε) όπως και στην ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών χάνεται ένα μεγάλο μέρος της γενετικής ποικιλότητας, αφού τυπικά μόνο ένα μικρό ποσοστό των νουκλεοτιδίων του DNA αποτιμάται ως προς την ποικιλομορφία του (το ποσοστό αυξάνει με την αύξηση των ενζύμων που χρησιμοποιούνται).[58]

**Πίνακας 7.** Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της PCR-RFLP μεθόδου.

|                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Πλεονεκτήματα</b> | Φθηνά.<br>Εύκολο να σχεδιαστεί.<br>Εφαρμόζεται για την ανάλυση των πολυμορφισμών μονού νουκλεοτιδίου, το ίδιο καλά με microindels.<br>Δεν υπάρχουν απαιτήσεις για τα ακριβά όργανα.<br>Δεν υπάρχουν απαιτήσεις για εκτενή κατάρτιση του προσωπικού των εργαστηρίων.                                                                                                                                                                             |
| <b>Μειονεκτήματα</b> | Απαιτεί ότι μια ποικιλία παράγει ή καταργεί μια θέση αναγνώρισης περιοριστικού ενζύμου.<br>Κάποια περιοριστικά ένζυμα είναι ακριβά.<br>Ακριβής γενεότυπος δεν μπορεί να επιτευχθεί όταν υπάρχει πάνω μία ποικιλία νουκλεοτιδίου σε ένα περιοριστικό ένζυμο αναγνωρισμένου site.<br>Χρειάζεται σχετικά μεγάλες ποσότητες χειροκίνησης (hand –on-time).<br>Μεγάλος χρόνος για να ολοκληρωθεί η ανάλυση.<br>Δεν είναι κατάλληλη για υψηλή ανάλυση. |

### **3) SSCP Analysis: Single Strand Conformation Polymorphism Analysis**

Η PCR-SSCP τεχνική είναι η απλούστερη και πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδος ανίχνευσης μεταλλάξεων. Η PCR χρησιμοποιείται για να ενισχύσει την ενδιαφερόμενη περιοχή και το προκύπτον DNA διαχωρίζεται ως μονόκλωνα μόρια με ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου [59]. Ένας κλώνος του μονόκλωνου DNA διπλώνει διαφορετικά από τον άλλο εφόσον διαφέρει από μία μόνο βάση, και πιστεύεται ότι οι μεταλλάξεις που προκαλούν μεταβολή της τριτοταγούς δομής του DNA έχει ως αποτέλεσμα διαφορετικές κινητικότητες για τους δύο κλώνους. Αυτές οι μεταλλάξεις ανιχνεύονται με την εμφάνιση νέων ζωνών σε αυτοραδιογραφήματα (ραδιενεργό ανίχνευση), με χρώση αργύρου των ζωνών ή με τη χρήση φθορίζοντων εκκινητών PCR οι οποίοι εν συνεχεία ανιχνεύονται από ένα αυτοματοποιημένο αλληλουχητή DNA (μη ραδιενεργό ανίχνευση).

Η τριτοταγής δομή του μονόκλωνου DNA αλλάζει υπό διαφορετικές φυσικές συνθήκες, π.χ. θερμοκρασία και ιοντικό περιβάλλον. Ως εκ τούτου, η ευαισθησία της SSCP μεθόδου εξαρτάται από αυτές (και πολλές άλλες) τις συνθήκες (βλέπε παρακάτω). Ενώ ορισμένοι εμπειρικοί κανόνες έχουν προκύψει για την επιλογή των συνθηκών διαχωρισμού διαφόρων αλληλουχιών σε συγκεκριμένα πλαίσια της αλληλουχίας, δεν είναι δυνατόν να προβλεφθεί αν μια συγκεκριμένη μετάλλαξη μπορεί να ανιχνευθεί υπό δεδομένες συνθήκες, ειδικά όταν η μετάλλαξη αυτή είναι σε ένα νέο πλαίσιο αλληλουχίας. Η ανίχνευση μετάλλαξης με την μέθοδο PCR-SSCP είναι γενικά υψηλή, > 80% κατά την ηλεκτροφόρηση μίας μονόκλωνης αλυσίδας για θραύσματα μικρότερα από 300 bp [60]. Καθώς η ευαισθησία δεν είναι 100%, η απουσία μιας νέας ζώνης δεν αποδεικνύει ότι δεν υπάρχει μετάλλαξη στο υπο ανάλυση μόριο.

Η ευαισθησία της PCR-SSCP μεθόδου μειώνεται με την αύξηση του μήκους των θραυσμάτων, <300bp είναι το βέλτιστο. Για την ανίχνευση μετάλλαξης σε μακρύτερα θραύσματα (εξόνια > 300bp και ολόκληρα cDNAs) επικαλυπτόμενα μικρά σετ εκκινητών μπορούν να χρησιμοποιηθούν, ή μεγαλύτερου μήκους PCR προϊόντα υποβάλλονται σε πέψη με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού πριν από την SSCP μέθοδο (ωστόσο, η εκ νέου ενίσχυση των μεμονωμένων νέων ζωνών με το αρχικό σετ εκκινητών δεν είναι τώρα πλέον δυνατή).

### **Πλεονεκτήματα**

Η SSCP μέθοδος έχει δύο βασικά πλεονεκτήματα ως μία τεχνική ανίχνευσης μεταλλάξεων:

-Μπορείς να ελέγξεις για ύπαρξη μεταλλάξεων σε μια καθορισμένη περιοχή του DNA με την επιλογή PCR εκκινητών που εκτείνονται σε αυτή την περιοχή.

-Μπορείς να ελέγξεις ένα μεγάλο αριθμό δειγμάτων, επειδή η τεχνική αυτή είναι απλή και γρήγορη.

Το μόνο βήμα που είναι απαραίτητο, μετά την ενίσχυση με PCR είναι η θερμική αποδιάταξη σε φορμαμίδιο και καυστικό νάτριο (NaOH).

### **Μειονεκτήματα**

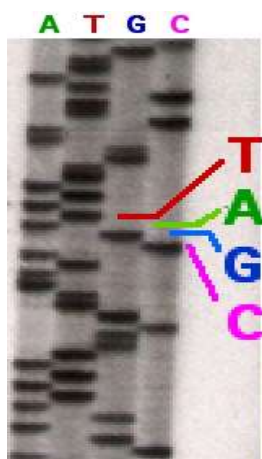
Η μέθοδος SSCP σου λέει μόνο ότι υπάρχει μια μετάλλαξη. Θα πρέπει στη συνέχεια να κάνεις μια αλληλούχηση του DNA (sequencing) για να προσδιοριστεί η φύση της μετάλλαξης που προκάλεσε μια μετατόπιση της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας ενός δεδομένου δείγματος.

Επιπλέον, σε μία δεδομένη αλληλουχία δεν θα προκαλέσουν ανιχνεύσιμη αλλαγή στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα όλες οι σημειακές μεταλλάξεις. Ωστόσο, βελτιστοποιώντας τις PCR αντιδράσεις και τις συνθήκες στις οποίες πραγματοποιούνται, πριν επιχειρήσετε έναν έλεγχο μεγάλης κλίμακας, μπορείτε να αυξήσετε την ευαισθησία [60].

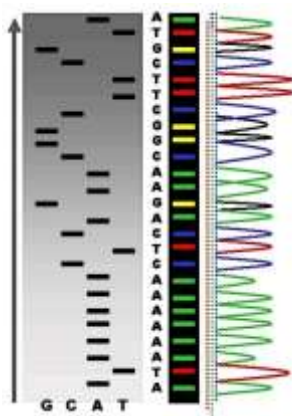
### **Παραλλαγές και τροποποιήσεις της SSCP μεθόδου:**

- Συνθήκες ηλεκτροφόρησης πολλών πηκτωμάτων.
  - Θερμοκρασία (~ θερμοκρασία δωματίου, ~4°C )
  - προσθήκη πρόσθετων π.χ. γλυκερόλη (5-10%), σακχαρόζη (10%)
- Διαφορετικά υποστρώματα πηκτωμάτων
  - Χαμηλό σε πολυακρυλαμίδη σύνδεσμο σε αναλογία (49: 1 ακρυλαμίδιο: δις-ακρυλαμίδιο) (5-10% πηκτώματα)
  - MDE, GeneAmp, Hydrolink gels
  - Πήκτωμα αγαρόζης (Monkton and Jeffreys, 1995)

#### 4)Αλληλούχιση DNA- PCR direct sequencing



Εικόνα 21



Εικόνα 22

Αν και όλοι οι γενετικοί δείκτες ποσοτικοποιούν (άμεσα ή έμμεσα) την ποικιλότητα σε επίπεδο DNA, η αλληλούχιση είναι η μόνη μέθοδος που επιτρέπει τον ακριβή προσδιορισμό των βάσεων που διαφέρουν μεταξύ των ατόμων. Αυτή είναι μια πολύ σημαντική ιδιότητα της αλληλούχισης του DNA, αφού δεν αφήνει περιθώρια αμφισβήτησης. Συγκρίνοντας δύο αλληλουχίες μπορούμε με ακρίβεια να πούμε πού και πόσο διαφέρουν. Με αυτό τον τρόπο μας δίνεται η δυνατότητα να συμπεράνουμε τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των διαφορετικών αλληλομόρφων. Σε γενικές γραμμές, όσο πιο πολλές αλλαγές έχουν από

κοινού δύο άτομα, τόσο πιο συγγενικά είναι. Όμως δεν εμφανίζουν όλες οι αλληλουχίες τον ίδιο ρυθμό υποκαταστάσεων. Αυτό αυτομάτως υποδηλώνει ότι μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε ταχέως εξελισσόμενες αλληλουχίες για την σύγκριση κοντινών εξελικτικά ατόμων και πιο αργών για απομακρυσμένα εξελικτικά τάξα. Τα τελευταία χρόνια, η επιλογή κατάλληλων γονιδιακών περιοχών για την διερεύνηση των εξελικτικών σχέσεων των ατόμων έχει διευκολυνθεί σημαντικά από την αυξημένη διαθεσιμότητα αλληλουχιών σε δικτυακές βάσεις δεδομένων

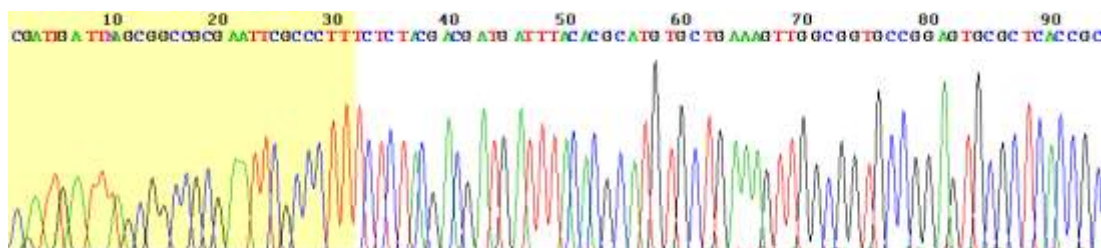
([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Ωστόσο, αν και η αλληλούχιση μπορεί να γίνει σε οποιαδήποτε γενωμική περιοχή, οι γνώσεις μας για τις χρωμοσωμικές αλληλουχίες εξακολουθούν να είναι ημιτελείς για τα περισσότερα τάξα και υπάρχει έλλειψη γενικευμένων εκκινητών. Οι γενικευμένοι εκκινητές είναι πολύ πιο άφθονοι για τα φυτικά και ιδιαίτερα για τα ζωικά οργανισμικά γονιδιώματα (π.χ. mtDNA). Παρά το γεγονός ότι η αλληλούχιση του DNA είναι εξαιρετικά πληροφοριακή, η πραγματοποίησή του είναι ακόμα και σήμερα χρονοβόρα και υψηλού κόστους.

Η πιο δημοφιλής μέθοδος για την αλληλούχιση DNA είναι γνωστή ως διδέοξυ μέθοδος ή μέθοδος τερματισμού της αλυσίδας [61]. Ως μέθοδος είναι πιο αποδοτική και χρησιμοποιεί λιγότερα τοξικά υλικά από ότι η μέθοδος των Maxam and Gilbert. Το κλειδί της μεθόδου είναι η χρήση διδέοξυ-νουκλεοτιδίων (ddNTPs) για τον τερματισμό της αλυσίδας του DNA. Ως τεχνική απαιτεί μία μονόκλωνη αλυσίδα DNA ως καλούπι (template), έναν εκκινητή (primer), μία DNA πολυμεράση, ραδιοσημασμένα ή φθορίζοντα νουκλεοτίδια και τροποποιημένα νουκλεοτίδια που

τερματίζουν την επιμήκυνση του DNA. Το δείγμα του DNA διαιρείται σε 4 ξεχωριστές αντιδράσεις αλληλουχίσης, που η καθεμία περιέχει τα νουκλεοτίδια (dATP, dGTP, dCTP and dTTP), την πολυμεράση και ένα από τα 4 διδεοξυνουκλεοτίδια (ddATP, ddGTP, ddCTP, or ddTTP), τα οποία στερούνται της 3'-OH που απαιτείται για το σχηματισμό του φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ δύο νουκλεοτιδίων [57].

Τα νέο-συντιθέμενα και σημασμένα θραύσματα DNA θερμαίνονται για να αποδιατακτούν (denaturation) και διαχωρίζονται βάσει μεγέθους σε πήκτωμα ηλεκτροφόρησης πολυακρυλαμίδης (με δυνατότητα ανάλυσης ενός νουκλεοτιδίου), όπου κάθε αντίδραση φορτώνεται σε μία από τις 4 σειρές στο πήκτωμα (μία για κάθε νουκλεοτίδιο). Οι ζώνες του DNA στην συνέχεια οπτικοποιούνται μέσω αυτοραδιογραφίας ή υπεριώδους φωτός (UV light) και η αλληλουχία διαβάζεται απευθείας από το X-ray φιλμ ή την φωτογραφία του πηκτώματος. Στην εικόνα 21, το X-ray φιλμ εκτέθηκε στο πήκτωμα και οι σκοτεινές ζώνες αντιστοιχούν στα θραύσματα DNA διαφορετικού μήκους. Μια μαύρη ζώνη σε μία σειρά (π.χ. στη σειρά του νουκλεοτιδίου A) υποδεικνύει ένα θραύσμα DNA που δημιουργήθηκε λόγω του τερματισμού της από την προσθήκη ενός διδεόξυ-νουκλεοτιδίου (π.χ. ddATP) στην θέση αυτή. Οι σχετικές θέσεις των διαφορετικών ζωνών DNA μεταξύ των 4 σειρών (μία για κάθε νουκλεοτίδιο) μας επιτρέπουν να διαβάσουμε την αλληλουχία του DNA (από κάτω προς τα πάνω).

Αν και η χειροκίνητη αλληλούχιση ήταν ο κανόνας τα προηγούμενα χρόνια, σήμερα έχει αντικατασταθεί από αυτοματοποιημένη διαδικασία, όπως η αλληλούχιση *Dye-terminator*. Η αλληλούχιση *Dye-terminator* εκμεταλλεύεται τη διαφορετική χρώση των ddNTPs, η οποία επιτρέπει την πραγματοποίηση της αλληλούχησης σε μία αντίδραση και όχι σε τέσσερις. Στη μέθοδο αυτή κάθε ένα από τα τέσσερα ddNTPs χρωματίζονται με διαφορετικές χρωστικές (fluorescent dyes), καθεμία από τις οποίες έχουν διαφορετικό μήκος κύματος φθορισμού ή εκπομπής. Ο περιορισμός αυτής έγκειται στα προβλήματα που δημιουργούν οι διαφορετικές χρωστικές, δίνοντας άνισες κορυφές και σχήματα στην ηλεκτρονική μορφή της αλληλουχίας του DNA (χρωματογράφημα, Εικόνα 22). Χαρακτηριστικό πρόβλημα των αλληλουχιών που παράγονται είναι η χαμηλή ποιότητα των παραγόμενων αλληλουχιών στα πρώτα 40-50 νουκλεοτίδια (εικόνα 23) και η χειροτέρευση της ποιότητάς της μετά τα 600-700 νουκλεοτίδια.[57]



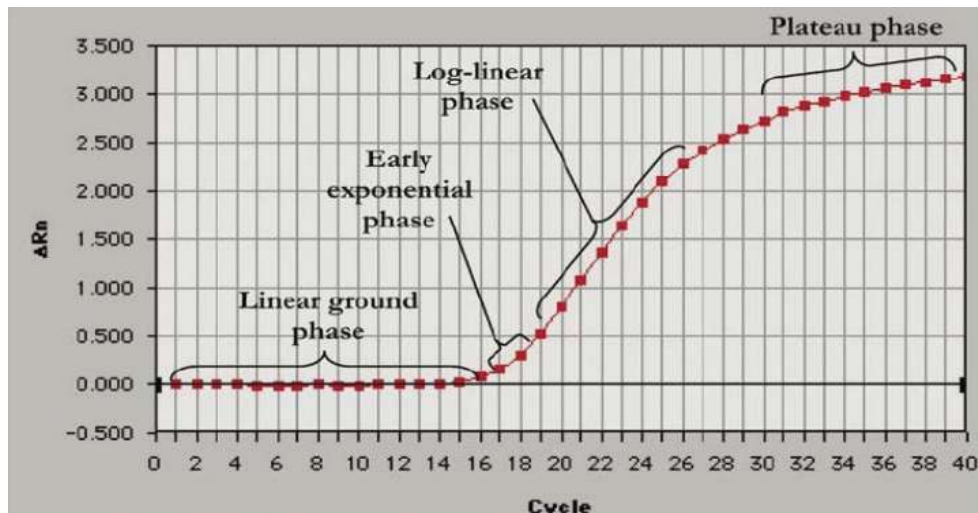
**Εικόνα 23:** Χρωματόγραμμα αλληλουχίας DNA. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7686270>

### **5)Πραγματικού χρόνου PCR μέσω ανάλυσης των καμπύλων τήξεως (real time PCR, melting curve analysis)**

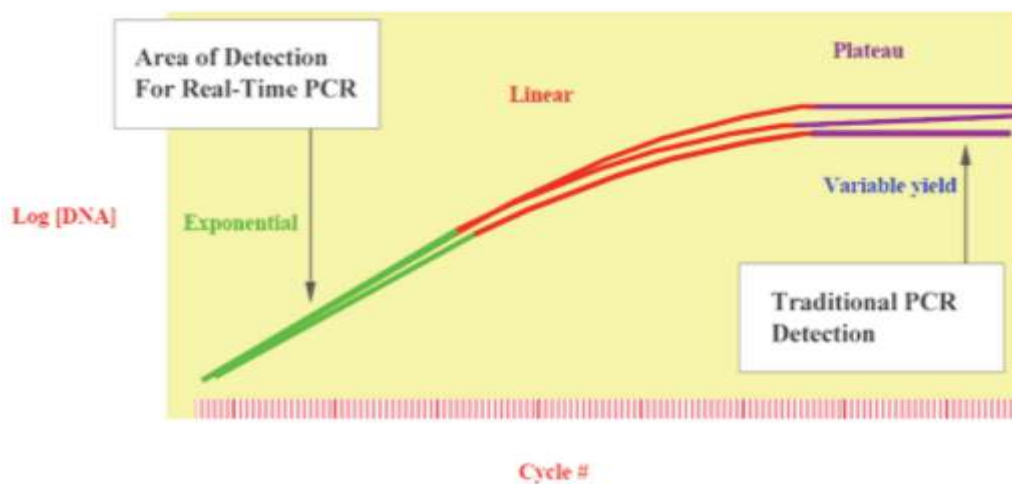
Βασίζεται στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ενός φθορίζοντος μορίου αναφοράς (ειδικού ή μη για συγκεκριμένη αλληλουχία) σε κάθε κύκλο της αντίδρασης PCR. Δεν απαιτείται ανάλυση με ηλεκτροφόρηση, μιας και η ηλεκτροφορητική ανάλυση χαρακτηρίζεται από χαμηλή ακρίβεια, χαμηλή ευαισθησία, μικρό δυναμικό εύρος < 2 logs, χαμηλή ανάλυση, συνήθως μη αυτοματοποιημένη (λίγες εξαιρέσεις), ανάλυση βάσει μεγέθους (κάποιες εξαιρέσεις), τα αποτελέσματα δεν εκφράζονται με αριθμούς, η χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο δεν είναι ποσοτική, τα ίδια αποτελέσματα με διαφορετική αρχική ποσότητα μήτρας, διαφορετικά αποτελέσματα με την ίδια αρχική ποσότητα μήτρας [62].

Η πρώτη σημαντική αύξηση στην ποσότητα του προϊόντος της PCR (CT – κύκλος - κατώφλι) σχετίζεται με την αρχική ποσότητα της μήτρας (ποσοτικοποίηση). Επιτρέπει την αδιάλειπτη παρακολούθηση των προϊόντων της PCR κατά την ενίσχυση μέσω της μέτρησης του εκπεμπόμενου φθορισμού των προϊόντων σε κάθε κύκλο (σε πραγματικό χρόνο). Ταυτοποίηση του κύκλου εισόδου στην εκθετική φάση (κύκλος-κατώφλι) και, της σχετικής ποσοτικοποίησης της μήτρας DNA στην αρχή της αντίδρασης.

Δεν απαιτείται καμία πειραματική διαδικασία μετά την αντίδραση. Τα προϊόντα του πολλαπλασιασμού αναλύονται σε πραγματικό χρόνο όπως συντίθενται σε κάθε κύκλο. Απόλυτη ποσοτικοποίηση σύμφωνα είτε με ένα εσωτερικό μάρτυρα που πολλαπλασιάζεται μαζί με το στόχο, είτε μέσω της χρήσης μιας πρότυπης καμπύλης που σχεδιάζεται μέσω παράλληλου πολλαπλασιασμού μιας σειράς γνωστών συγκεντρώσεων μιας αλληλουχίας αναφοράς[62].



Εικόνα 24: Η καμπύλη πολλαπλασιασμού της πραγματικού χρόνου PCR.



Εικόνα 25: Εύρος περιοχής ανιχνεύσης της Q-PCR σε σχέση με την κλασική PCR.

### Q PCR Ποσοτικές δοκιμές

1. Ιχνηθέτες υδρόλυσης (TaqMan, Molecular Beacons)
2. Ιχνηθέτες υβριδοποίησης - FRET (HybProbes, Simple Probes (Light Cycler),
3. Φθορίζουσες χρωστικές που δεσμεύονται σε δίκλωνο (ds) DNA (SYBR Green, Eva Green, LC Green,

### **Βασικές αρχές των μεθόδων ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου**

1) Ιχνηθέτες υδρόλυσης: Ο ιχνηθέτης υδρόλυσης είναι συνδεδεμένος με ένα μόριο αναφοράς που εκπέμπει φθορισμό και ένα μόριο το οποίο απορροφά τον φθορισμό από το μόριο αναφοράς (quencher) όσο ο ιχνηθέτης είναι άθικτος. Καθώς προχωρά η ενίσχυση των μορίων DNA στα οποία είναι συνδεδεμένος, ο ιχνηθέτης υδρόλυσης εκτοπίζεται και στη συνέχεια υδρολύεται από την πολυμεράση Taq. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο διαχωρισμό του μορίου αναφοράς από τον quencher και επομένως ο φθορισμός του μορίου αναφοράς γίνεται ανιχνεύσιμος. Σε κάθε επόμενο κύκλο PCR ο φθορισμός αυξάνεται εκθετικά καθώς συσσωρεύεται προϊόν.

2) Ιχνηθέτες υβριδοποίησης: Στην τεχνική αυτή χρησιμοποιούνται δύο ιχνηθέτες με γειτονικές αλληλουχίες- ο ένας φέρει μια φθορίζουσα ομάδα δότη και ο δεύτερος μια ομάδα - δέκτη. Όταν οι δύο ομάδες βρίσκονται πολύ κοντά (1–5 νουκλεοτίδια), ο εκπεμπόμενος από το δότη φθορισμός διεγείρει την φθορίζουσα ομάδα δέκτη (FRET). Κατ' αυτό τον τρόπο είναι δυνατή η ανίχνευση του φθορισμού κατά τη φάση της υβριδοποίησης των ιχνηθετών και στα αρχικά στάδια της επιμήκυνσης. Καθώς μετά από κάθε κύκλο συσσωρεύεται μεγαλύτερη ποσότητα προϊόντος περισσότερα μόρια ιχνηθετών αλληλεπιδρούν και επομένως καταγράφεται περισσότερος φθορισμός .

3) Φθορίζουσες χρωστικές που δεσμεύονται στο δίκλωνο DNA (π.χ. SYBR Green): Ο φθορισμός της χρωστικής SYBR Green ενισχύεται δραματικά μετά την πρόσδεσή της σε δίκλωνο DNA. Στη φάση της επιμήκυνσης αυξανόμενη ποσότητα SYBR Green προσδένεται στο συσσωρευόμενο προϊόν της PCR μετά από κάθε κύκλο. Καθώς η αντίδραση προχωρά τα επίπεδα του φθορισμού που ανιχνεύεται αυξάνονται συνεχώς [62].

### **Πλεονεκτήματα της PCR πραγματικού χρόνου**

Η ενίσχυση (πολλαπλασιασμός) μελετάται σε πραγματικό χρόνο. Δεν απαιτούνται χειρισμοί μετά την PCR και έτσι υπάρχει δυνατότητα χειρισμού πολλών δειγμάτων, και μικρή πιθανότητα επιμόλυνσης. Δυνατότητα μεγάλης ταχύτητας (ακόμη και 25 λεπτά) Μεγαλύτερο δυναμικό εύρος μέχρι και  $10^{10}$  φορές. Απαιτήση για μικρές ποσότητες μήτρας ως 1000 φορές λιγότερο σε σχέση με τις κλασικές μεθόδους (ελάχιστο 6 picogram = ισοδύναμο ενός διπλοειδούς γονιδιώματος). Η ανάλυση με την καμπύλη τήξης επιβεβαιώνει την ειδικότητα. Πιο ειδικά, πιο

ευαίσθητα και επαναλήψιμα αποτελέσματα. Λίγο μόνο πιο ακριβή από τη συμβατική PCR (εκτός από το κόστος εξοπλισμού).

Εξελικτικά από τα μηχανήματα PCR πραγματικού χρόνου στα συστήματα digital PCR και chip πραγματικού χρόνου. Σύντομα αναμένεται σε επίπεδο διάγνωσης και η αλληλούχηση επόμενης γενιάς η οποία πιθανότητα να αντικαταστήσει την Real Time PCR.

## **6) Multiplex-PCR**

Η τεχνική Multiplex-PCR χρησιμοποιεί αρκετά ζεύγη εκκινητών σε διαφορετικές αλληλουχίες στόχους. Αυτό επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση πολλαπλών στόχων σε ένα μόνο δείγμα. Για παράδειγμα, στον έλεγχο για γενετικές μεταλλάξεις, έξι ή περισσότερες ενισχύσεις θα μπορούσαν να συνδυαστούν. Στο πρωτόκολλο ελέγχου για DNA δακτυλικά αποτυπώματα, οι στόχοι που προσδιορίστηκαν συχνά ενισχύονται σε ομάδες των 3 ή 4. Η Multiplex Ligation-εξαρτώμενη από ανιχνευτές ενίσχυσης (ή MLPA) επιτρέπει την ενίσχυση πολλαπλών στόχων χρησιμοποιώντας ένα μόνο ζεύγος εκκινητών, αποφεύγοντας τους περιορισμούς ανάλυσης της πολλαπλής PCR. Η Multiplex PCR έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση των μικροδορυφόρων και SNPs [63].

## **7) PASA- ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλομόρφων ( pcr amplification of specific alleles) ή PCR-SSP (Sequence Specific Priming)**

Μία μέθοδος που ονομάζεται PCR ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλομόρφων (PASA), ή PCR-SSP (Sequence Specific Priming) είναι μία γενικά εφαρμόσιμη τεχνική για την ανίχνευση γνωστών σημειακών μεταλλάξεων, μικρές εξαλείψεις και ενθέσεις, πολυμορφισμών και άλλες παραλλαγές που μπορεί να έχει μια αλληλουχία. Η PASA είναι μια τροποποίηση της PCR που εξαρτάται από τη σύνθεση ενός ολιγονουκλεοτιδίου PCR εκκινητή που ταιριάζει ακριβώς με ένα από τα αλληλόμορφα αλλά αναντιστοιχεί με το άλλο. Όταν η αναντιστοιχία παρουσιάζεται πλησίον του άκρου 3' του PCR εκκινητή, η ενίσχυση είναι αναποτελεσματική. Ουσιαστικά μόνο η αλληλουχία του εκκινητή στο 3' άκρο είναι υπεύθυνη για την ειδικότητα του προς αναγνώριση αλληλομόρφου. Για ολοκληρωμένη PCR-SSP ανάλυση, πραγματοποιούνται παράλληλα αρκετές ενισχύσεις. Ως εκ τούτου, λαμβάνεται η προτιμότερη ενίσχυση των τέλεια ταιριασμένων αλληλομόρφων. Η

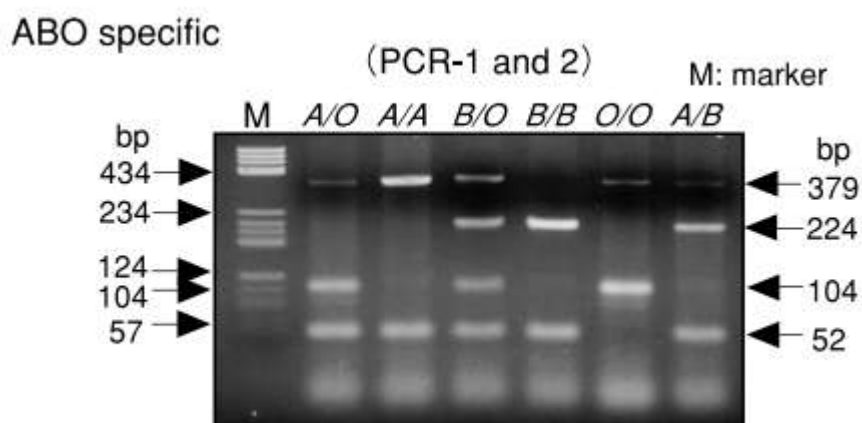
μέθοδος είναι γενικά εφαρμόσιμη καθώς όλα τα πιθανά αλληλόμορφα μπορούν να διακριθούν αξιόπιστα. Η ευκολία και η τεχνική απλότητα της PASA κάνει τις γενετικές αναλύσεις πιο προσιτές. Η PASA μπορεί επίσης να προσαρμοστεί ώστε να εξυπηρετεί συγκεκριμένες ανάγκες και μπορεί να επεκταθεί με την ενσωμάτωση άλλων τεχνικών. Επιπλέον, η PASA είναι πολλά υποσχόμενη τεχνική μιας και είναι γρήγορη, εφαρμόσιμη σε μεγάλο πληθυσμό ατόμων ως screening test , πολύ επαναλήψιμη, φθηνή, μη-ισοτοπική, και μπορεί να τροποποιηθεί για την αυτοματοποίησή της.[12]

### **Σύγκριση των μεθόδων**

Οι μέθοδοι PCR-RFLP, PCR-direct sequencing και PCR-SSCP απαιτούν διαδικασίες δύο σταδίων, και επιπλέον δεν είναι εύκολες να χρησιμοποιηθούν σε κλινικά εργαστήρια. Η PASA μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι η PCR ενίσχυση συμβαίνει μόνο όταν το 3' άκρο του εκκινήτη αντιστοιχείται με το νουκλεοτίδιο στη θέση 261, 526, 796 ή 803 (οι θέσεις αντικατάστασης των αμινοξέων) των cDNA ABO αλληλομόρφων, και τρεις ή πέντε περιοχές αλληλομόρφων DNAs είχαν συνενισχυθεί σε μονή PCR (multiplex-PCR) σε αυτή τη μελέτη [32, 36-39]. Οι γονότυποι των ABO και cisAB ομάδων αίματος είχαν καθοριστεί άμεσα, βασιζόμενοι στο μοριακό βάρος των ενισχυμένων προϊόντων ειδικών αλληλομόρφων. Η PASA μέθοδος απαιτεί μόνο περίπου 4 ώρες από την έναρξη της PCR έως το τέλος της ανάλυσης. Ως εκ τούτου, η μέθοδος PASA είναι ταχεία, απλή και χρήσιμη για την ανίχνευση του γονοτύπου των ABO και cisAB ομάδων αίματος σε σύγκριση με τις μεθόδους PCR-RFLP, PCR-direct sequencing και PCR-SSCP και χρησιμοποιείται ευρέως σε όλη την έρευνα και τα κλινικά εργαστήρια. Το σύστημα της μεθόδου ενίσχυσης και της ανάλυσης των συγκεκριμένων ABO και cisAB αλληλομόρφων με τη μέθοδο PASA παρουσιάζεται στην εικόνα 28 [38].

### **I) ABO γονοτυπική ανάλυση**

Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 26 [37], όλα τα γονίδια και των 6 βασικών ABO γονοτύπων, A/O, A/A, B/O, B/B, O/O και A/B ενισχύθηκαν: τρεις συγκεκριμένες ζώνες (379, 104 και 52 bp) για τον A/O, δύο συγκεκριμένες ζώνες (379 και 52 bp) για τον A/A, τέσσερις ζώνες (379, 224, 104 και 52 bp) για τον B/O, δύο ζώνες (224 και 52 bp) για τον B/B, δύο ζώνες (379 και 104 bp) για τον O/O και τρεις ζώνες (379, 224 και 52 bp) για τον A/B.



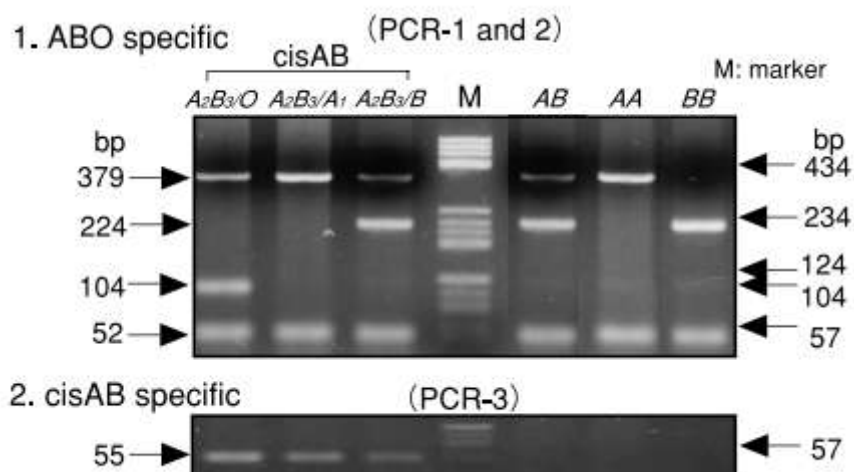
**Εικόνα 26:** Ηλεκτροφορητικά πρότυπα των προϊόντων PCR σε έξι σημαντικούς ABO γονότυπους. Γενομικό DNA που εξάγεται από λευκοκύτταρα, ενισχύθηκε με τη μέθοδο PASA χρησιμοποιώντας 4 σετ εκκινητών/primer (primer 1 και 2, primer 3 και 4, primer 5 και 6, και primer 7 και 8, ). Με τη, Hae III έκοψαν το πλασμιδιακό DNA pBR322 και το χρησιμοποίησαν ως marker. Το πάνελ δείχνει ABO συγκεκριμένα αλληλόμορφα

### **-cisAB γονοτυπική ανάλυση**

Όπως φαίνεται στην εικόνα 27 [37, 38], όλα τα γονίδια των τριών κύριων cisAB γονοτύπων,  $A^2B^3/O$ ,  $A^2B^3/A^1$  και  $A^2B^3/B$  ενισχύθηκαν και στο gel αγαρόζης ύστερα από ηλεκτροφόρηση φαίνονται οι χαρακτηριστικές μπάντες του κάθε γονοτύπου. Έχουμε λοιπόν τέσσερις συγκεκριμένες μπάντες-ζώνες (379, 104, 52 και 55 bp) για τον γονότυπο  $A^2B^3/O$ , τρεις μπάντες (379, 52 και 55 bp) για τον γονότυπο  $A^2B^3/A^1$  και τέσσερις μπάντες (379, 224, 52 και 55 bp) για τον  $A^2B^3/B$ .

Ο πίνακας 8 συνοψίζει όλα τα πιθανά πρότυπα των συγκεκριμένων ζωνών των ABO γονοτύπων που παρατηρήθηκαν με την PASA μέθοδο. Οι γονότυποι των ABO και

cisAB ομάδων αίματος καθορίστηκαν άμεσα, βασιζόμενοι στο μοριακό βάρος των ενισχυμένων προϊόντων των ειδικών-αλληλομόρφων. Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των τριών βασικών θεμάτων στην cisAB ομάδα αίματος αποκαλύπτει χημεικές δομές των A και B αλληλομόρφων για το ίδιο γονίδιο.



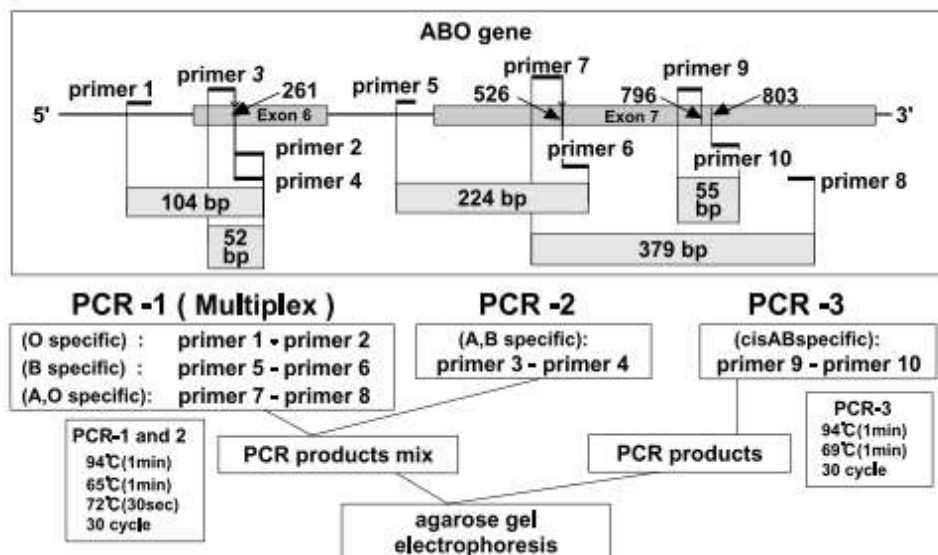
**Εικόνα 27:** Ηλεκτροφορητικά πρότυπα των προϊόντων PCR σε τρεις σημαντικούς cisAB γονότυπους. Γενωμικό DNA που εξάγεται από λευκοκύτταρα, ενισχύθηκε με τη μέθοδο PASA χρησιμοποιώντας 5 σετ εκκινητών/primer (primer 1 και 2, primer 3 και 4, primer 5 και 6, primer 7 και 8, και primer 9 και 10). Οι, Hae III έκοψαν το πλασμιδιακό DNA pBR322 και το χρησιμοποίησαν ως marker. Το πάνω πάνελ δείχνει ABO συγκεκριμένα αλληλόμορφα και το κάτω πάνελ cisAB συγκεκριμένα αλληλόμορφα

**Πίνακας 8:** Τα πρότυπα αποτελέσματα των PASA μεθόδων για όλους τους πιθανούς ABO γονότυπους.

| bp<br>(Αλληλόμορφα<br>συγκεκριμένης<br>ζώνης) |            |     |     |     |     | CisAB                            |                                               |                                  |
|-----------------------------------------------|------------|-----|-----|-----|-----|----------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------|
|                                               | A/O<br>A/B | A/A | B/O | B/B | O/O | A <sup>2</sup> B <sup>3</sup> /O | A <sup>2</sup> B <sup>3</sup> /A <sup>1</sup> | A <sup>2</sup> B <sup>3</sup> /B |
| α) 379 (A, O<br>συγκεκριμένα)                 | +          | +   | +   | -   | +   | +                                | +                                             | +                                |
| β) 224 (B<br>συγκεκριμένα)                    | -          | -   | +   | +   | -   | -                                | -                                             | +                                |
| γ) 104 (O<br>συγκεκριμένα)                    | +          | -   | +   | -   | +   | +                                | -                                             | -                                |
| δ) 52 (A, B<br>συγκεκριμένα)                  | +          | +   | +   | +   | -   | +                                | +                                             | +                                |
| ε) 55 (cisAB<br>συγκεκριμένα)                 | -          | -   | -   | -   | -   | +                                | +                                             | +                                |

+, Παρουσία του αναμενόμενου γονιδιακού θραύσματος του ειδικού τύπου ABO. -, Απουσία του αναμενόμενου γονιδιακού θραύσματος του ειδικού τύπου ABO. (α) συγκεκριμένες ζώνες των A και O αλληλομόρφων χρησιμοποιώντας τους εκκινητές (7 και 8). (β), συγκεκριμένες ζώνες του B

αλληλομόρφου χρησιμοποιώντας τους εκκινητές (5 και 6). (c) συγκεκριμένες ζώνες του O αλληλομόρφου χρησιμοποιώντας τους εκκινητές (1 και 2). (d) συγκεκριμένες ζώνες των A και B αλληλομόρφων χρησιμοποιώντας τους εκκινητές (3 και 4). (e) συγκεκριμένες ζώνες του cisAB αλληλομόρφου χρησιμοποιώντας τους εκκινητές (9 και 10).



**Εικόνα 28:** Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου ενίσχυσης και ανάλυσης συγκεκριμένων ABO αλληλομόρφων χρησιμοποιώντας την PASA μέθοδο. Τα 3' άκρα των primer(εκκινητών) 2, 3 και 4, 6, 7, 9 και 10 αντιστοιχούν προς τις αλληλουχίες των νουκλεοτιδίων O, A και B, B, A και O, και cisAB αλληλομόρφων αντίστοιχα. Οι primers 1, 5 και 8 αντιστοιχούν στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των ABO αλληλομόρφων. Αλληλομόρφο-ειδικών θραυσμάτων DNA του O αλληλομόρφου (104 bp), A και B αλληλομόρφα (52bp), B αλληλομόρφο (224bp), A και O αλληλομόρφο (379bp) και cisAB (55bp) ενισχύθηκαν μέσω της PCR μεθόδου με 5 ζευγάρια primers (primer 1 και 2, primer 3 και 4, primer 5 και 6, primer 7 και 8, και primer 9 και 10), αντίστοιχα. Τρία (104 bp, 224bp και 379bp) ή πέντε κομμάτια είχαν συνενισχυθεί σε μία μόνο PCR-1 (multiplex-PCR).

## 2.2 Καταγραφή και ανάλυση των γονιδιακών αλληλόμορφων που εμφανίζονται στο ABO σύστημα μέσω των διαφορετικών τεχνικών PCR.

Οι ανοσολογικές ιδιότητες του ABO συστήματος αναγνωρίστηκαν στο γύρισμα του αιώνα. Παρόλα αυτά οι γενετικές βάσεις του ABO συστήματος χαρακτηρίστηκαν πρόσφατα. Αυτό επέτρεψε την ανάπτυξη ενός μεγάλου αριθμού μοριακών μεθόδων προσδιορισμού της ABO ομάδας αίματος.

Το ABO γονίδιο καταλαμβάνει μια περιοχή 18kb στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 9 [25, 34]. Το γονίδιο αποτελείται από 7 εξόνια που ποικίλουν σε μέγεθος από 28 μέχρι 688 βάσεις, το μεγαλύτερο εξόνιο είναι το 7 [25]. Το μεταγραφόμενο mRNA μεγέθους 1062 βάσεων, κωδικοποιεί μια γλυκοσυλτρανσφεράση μεγέθους 41kDa [35]. Γονοτυπικά το O<sub>1</sub> αλληλόμορφο διαφέρει από το A<sub>1</sub> αλληλόμορφο κατά μία έλλειψη νουκλεοτιδικής βάσεις στη θέση

261. Αυτή η έλλειψη οδηγεί την αλληλουχία εκτός πλαισίου ανάγνωσης, δημιουργώντας ένα πρώιμο κωδικόνιο λήξης στη νουκλεοτιδική θέση 352±354 [35]. Το O<sub>1</sub> θεωρείται είτε ότι είναι σιωπηλό αλληλόμορφο ή ότι μεταφράζεται σε ένα ενζυματικά ανενεργό αμινοξικό πεπτίδιο που του λείπει η λειτουργική περιοχή της γλυκοσυλτρανσφεράσης [35]. Δύο νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις διαχωρίζουν το A<sub>1</sub> από το A<sub>2</sub> αλληλόμορφο: 467 (C→T, Pro-Leu) και 1059 (C→-, αλλαγή πλαισίου ανάγνωσης). Η έλλειψη βάσης στη θέση 1059 προκαλεί ένα νέο πλαίσιο ανάγνωσης που έχει ως αποτέλεσμα την προσθήκη 21 αμινοξικών καταλοίπων στο καρβοξυτελικό άκρο της τρανσφεράσης [46]. Το A<sub>1</sub> με το O<sub>2</sub> αλληλόμορφο διαφέρουν μεταξύ τους σε 3 βάσεις, 2 από τις οποίες οδηγούν σε αντικατάσταση αμινοξέως: 297 (A→G, σιωπηλή), 526 (C→G, Arg→Gly) και 802 (G→A, Arg→Gly) [53]. Οι νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις στις θέσεις 297 και 526 παρατηρούνται επίσης και στο B αλληλόμορφο, αφήνοντας τη θέση 802 ως την κύρια νουκλεοτιδική αντικατάσταση υπεύθυνη για τη μη λειτουργικότητα της κωδικοποιούμενης γλυκοσυλτρανσφεράσης. Τέλος υπάρχουν 7 νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις μεταξύ του A<sub>1</sub> και B αλληλομόρφου: 297 (A-G, σιωπηλή), 526 (C-G, Arg-Gly), 657 (C-T, σιωπηλή), 703 (G-A, Gly-Ser), 796 (C-A, Leu-Met), 803 (G-C, Gly-Ala) και 930 (G-A, σιωπηλή) [35]. Οι νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις στις θέσεις 703, 796, και 803 είναι κρίσιμες στο καθορισμό της ειδικότητας της γλυκοσυλτρανσφεράσης [32].

### **2.2.1. Ανάλυση των αλληλομόρφων μέσω της PASA μεθόδου**

Η ειδική για το αλληλόμορφο αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (ASPCR, Allele-specific polymerase chain reaction) ή PASA (pcr amplification of specific alleles) ή PCR-SSP (Sequence Specific Priming), παρέχει μια πολύ δυνατή τεχνική για τον διαχωρισμό των αλληλομόρφων που προκύπτουν από αντικαταστάσεις και ελλείψεις μία μόνο βάσης χωρίς την αναγκαιότητα ύπαρξης μετά-ενισχυμένων περιοριστικών ενδονουκλεασών πέψης ή υβριδισμού. Όπως περιγράφεται σε αυτή την αναφορά η ASPCR ή PASA είναι μια πολλαπλή δοκιμασία δύο αντιδράσεων για άμεση γονοτύπιση των A<sub>2</sub>, B, O<sub>1</sub> και O<sub>2</sub> αλληλομόρφων και έμμεση γονοτύπιση του A<sub>1</sub> αλληλομόρφου. Εκκινητές ειδικοί για τα αλληλόμορφα επιλέχθηκαν για να

χρησιμοποιηθούν σε μια πολλαπλή ‘θετική’ (+) αντίδραση, για να ανιχνεύσουν την παρουσία του O<sub>1</sub> αλληλομόρφου στη θέση της νουκλεοτιδικής βάσης 261, του O<sub>2</sub> στη θέση 802, του B στη θέση 803, και του A<sub>2</sub> στη θέση 1059. αντίστοιχει συναινετικοί εκκινητές σχεδιάστηκαν για να χρησιμοποιηθούν σε μια πολλαπλή ‘αρνητική’ (-) αντίδραση για να ανιχνεύσουν την απουσία των O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub>, B και A<sub>2</sub>. Μια έγκυρη μελέτη διεξήχθη για να συσχετίσει την γονοτύπηση του ABO συστήματος με την ευθεία και την ανάστροφη ορολογική μέθοδο ανοσοφαινοτύπησης της ABO ομάδας αίματος σε δείγματα με περιφερικό αίμα από 122 καυκάσιους δότες [64].

Σχεδιασμός και σύνθεση εκκινητών: Οι ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών και οι θέσεις τους απεικονίζονται στον πίνακα 9. Όλοι οι εκκινητές δυνητικά παρεμβαίνουν στη δευτεροταγή δομή. Οι θέσεις των ζευγαριών των εκκινητών επιλέχθηκαν έτσι ώστε όλα τα προϊόντα που προκύπτουν από μία πολλαπλή αντίδραση να είναι διακριτά κατά την ηλεκτροφορήσή τους σε ένα 2% τζελ αγαρόζης. Οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές, ειδικοί-αλληλομόρφων που επιλέχθηκαν είχαν τη βάση που διέφερε στο αλληλόμορφο στη θέση 3’ ή στην παραλήγων 3’ θέση. Η ειδικότητα των αλληλομόρφων ήταν επιπλέον ενισχυμένη εισάγοντας επιπρόσθετες αναντιστοιχίες στην ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία του εκκινητή στην περιοχή πριν από την βάση που διαφέρει στο αλληλόμορφο [64].

**Πίνακας 9:** Ειδικοί για τα αλληλόμορφα εκκινητές για την γονοτύπηση των A<sup>1,2</sup>, B, O<sup>1,2</sup>.

| Εκκινητής                             | Συχνότητα                          | Θέση                                                                             |
|---------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| ABOx6O <sup>1</sup>                   | tTaaGTGGAAGGATGTCCTCGTcGT <u>A</u> | βάσεις 236±262 (O <sup>1</sup> )                                                 |
| ABOx6O <sup>1</sup> notO <sup>1</sup> | TaaGTGGAAGGATGTCCTCGTcGT <u>G</u>  | βάσεις 237±261 (A <sup>1</sup> .A <sup>2</sup> .O <sup>2</sup> .B)               |
| ABOx7A <sup>2</sup>                   | gAGGCGGTCCGGAAGc <u>G</u>          | βάσεις 1043±1059 (A <sup>2</sup> )                                               |
| ABOx7notA <sup>2</sup>                | gAGGCGGTCCGGAACaC <u>G</u>         | βάσεις 1043±1060 (A <sup>1</sup> .O <sup>1</sup> .O <sup>2</sup> .B)             |
| ABOx7O <sup>2</sup>                   | tCGACCCCCCGAAGAAgC <u>T</u>        | βάσεις 802±820 (O <sup>2</sup> )                                                 |
| ABOx7notO <sup>2</sup>                | CCGACCCCCCGAAGAAcgC <u>G</u>       | βάσεις 802±820 (A <sup>1</sup> .O <sup>1</sup> .A <sup>2</sup> .B)               |
| ABOx7B                                | GGCGATTTCTACTACATGGGGAC <u>G</u>   | βάσεις 781±803 (B)                                                               |
| ABOx7notB                             | GGCGATTTCTACTACATGGGGAG <u>G</u>   | βάσεις 781±803 (A <sup>1</sup> .O <sup>1</sup> .A <sup>2</sup> .O <sup>2</sup> ) |
| ABOx6con                              | aTaTatATGGCAAACACAGTTAACCCAATG     | βάσεις 1043±1060(A <sup>1</sup> .O <sup>1</sup> .O <sup>2</sup> .B)              |
| ABOx7con                              | GATCAGTGACTTCTGCGAGCGGC            | βάσεις 572±594 (εξόνιο 7<br>συνεναιτικός αλγόριθμος)                             |
| ABOi7con                              | AATGGTGTCTCTGTGGTGGGGA             | βάσεις 1219±1340 (εσώνιο 7<br>συνεναιτικός αλγόριθμος)                           |

Τα νουκλεοτίδια που διαφέρουν στα αλληλόμορφα υπογραμμίζονται. Νουκλεοτίδια μη συμπληρωματικά με τη στοχευμένη περιοχή είναι σε χαμηλότερη κατάσταση.

Παραγωγή των  $O^2$  και  $A^2$  περιοχών ελέγχου: Άτομα ομόζυγα για τον  $A^2$  και  $O^2$  γονότυπο είναι σπάνια. Προκειμένου να ελεγχθεί η ειδικότητα των εκκινητών για  $A^2$ , όχι  $A^2$ ,  $O^2$ , όχι  $O^2$ , τα προϊόντα της PCR του εξωνίου επτά πάρθηκαν με τους εκκινητές ABOx7con και ABOi7con χρησιμοποιώντας γενωμικό DNA που είχε απομονωθεί από ένα  $A^1/A^2$  και  $O^1/O^2$  ετεροζυγότη. Ύστερα αυτά τα προϊόντα συνδέθηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα PCR 1.1 (Invitrogen), κλωνοποιήθηκαν σε βακτηριακά κύτταρα TOP10F' E.coli (Invitrogen) και αναπτύχθηκαν σε ειδικά τρυβλία σύμφωνα με της οδηγίες της εταιρείας. Οι κλώνοι που διαθέτουν το κατάλληλο ένθετο  $A^2$  και  $O^2$  του εξωνίου επτά ταυτοποιήθηκαν μέσω ανάλυσης της αλληλουχίας (sequencing analysis) [64].

**Πίνακας 10.** Γονοτύπιση προτύπων για τα  $A^1$ ,  $A^2$ ,  $O^1$ ,  $O^2$  και B αλληλόμορφα

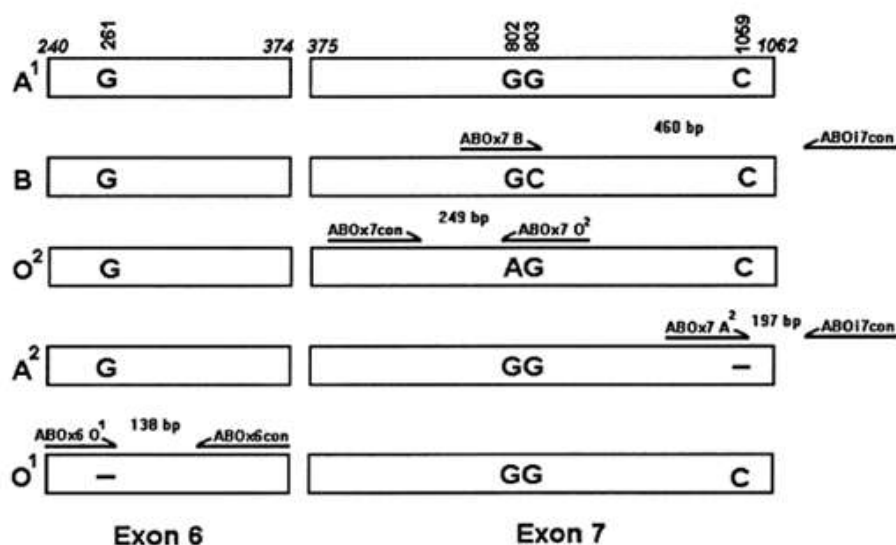
|                          | $A^1$       |   | $A^2$       |   | $O^1$       |   | $O^2$       |   | B           |   |
|--------------------------|-------------|---|-------------|---|-------------|---|-------------|---|-------------|---|
|                          | αλληλόμορφο |   | αλληλόμορφο |   | αλληλόμορφο |   | αλληλόμορφο |   | αλληλόμορφο |   |
|                          | +           | - | +           | - | +           | - | +           | - | +           | - |
| Συνεναιτικό              | +           | + | +           | + | +           | + | +           | + | +           | + |
| $B/\text{not } B'$       | -           | + | -           | + | -           | + | -           | + | +           | - |
| $O^2/\text{not } O^{2'}$ | -           | + | -           | + | -           | + | +           | - | -           | + |
| $A^2/\text{not } A^{2'}$ | -           | + | +           | - | -           | + | -           | + | -           | + |
| $O^1/\text{not } O^{1'}$ | -           | + | -           | + | +           | - | -           | + | -           | + |

Στον πίνακα φαίνεται η '+' και '-' πρότυπη αντίδραση για κάθε αλληλόμορφο. Οι γονότυποι ετερόζυγων δειγμάτων εμφανίζονται ως δύο σχετικά πρότυπα αντιδράσεων που προεξέχουν το ένα πάνω από το άλλο.

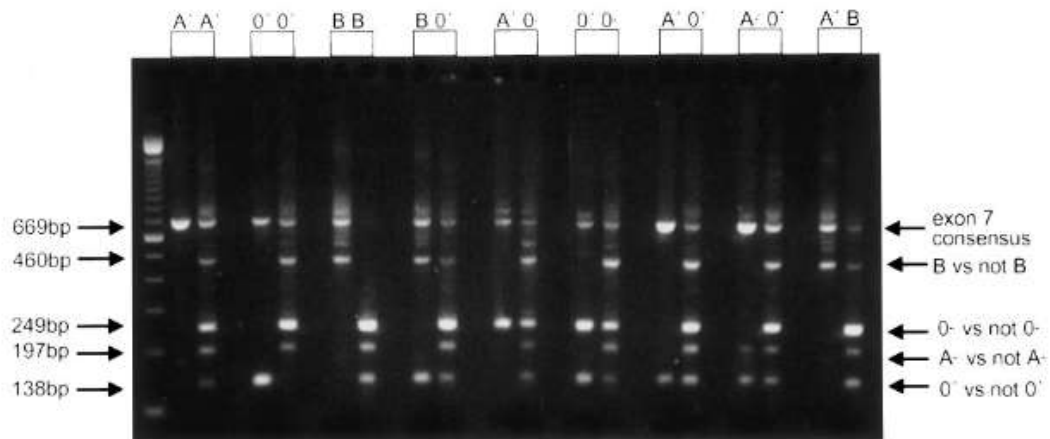
Αποτελέσματα: το γεγονός ότι η Taq πολυμεράση δεν επεκτείνει αποτελεσματικά τον εκκινητή όταν το 3' νουκλεοτίδιο δεν είναι συμπληρωματικό με την DNA περιοχή, είναι η βάση για τον διαχωρισμό των αλληλομόρφων στην ASPCR ή PASA μέθοδο. Σε αυτή την δύο αντιδράσεων δοκιμασία ABO γονοτύπισης, οι ειδικοί-αλληλομόρφων εκκινητές επιλέχθηκαν για να διαφοροποιήσουν τα B από τα 'μη' B αλληλόμορφα στη θέση 803, τα  $O^2$  από τα 'μη'  $O^2$  αλληλόμορφα στη θέση 802, τα  $A^2$  από τα 'μη'  $A^2$  αλληλόμορφα στη θέση 1059, και τα  $O^1$  από τα 'μη'  $O^1$  αλληλόμορφα στη θέση 1059.

Στην '+' αντίδραση, οι εκκινητές ειδικών-αλληλομόρφων για τα B,  $O^2$ ,  $A^2$  και  $O^1$  αλληλόμορφα ενδεχομένως κατευθύνουν την ενίσχυση των προϊόντων 460bp, 249bp,

197bp και 138bp, αντίστοιχα, ανάλογα από τα αλληλόμορφα που είναι παρόντα στην περιοχή στόχο. Εναλλακτικά η ‘-’ αντίδραση κατέχει εκκινητές ειδικούς για τα αλληλόμορφα για την πιθανή ενίσχυση των ‘μη B’, ‘μη O<sup>2</sup>’, ‘μη A<sup>2</sup>’, και ‘μη O<sup>1</sup>’ αλληλομόρφων που εξαρτάται επίσης από τα αλληλόμορφα που είναι παρόντα στην περιοχή στόχο. Παρόμοια, αυτά τα προϊόντα έχουν μήκος 460bp, 249bp, 198bp και 138bp, αντίστοιχα. Η παρουσία του A<sup>1</sup> αλληλομόρφου καθορίζεται έμμεσα μέσω του αποκλισμού άλλων γνωστών αλληλομόρφων. Ένα θετικό προϊόν ελέγχου 669bp πάντα παράγεται στην ‘+’ και στην ‘-’ αντίδραση μέσω του ζευγαρώματος του ευθύ (ABOx7con) και του ανάστροφου συναινετικού εκκινητή (ABOi7con) του εξωνίου 7. Το πρότυπο των θετικών και αρνητικών ενισχύσεων για κάθε αλληλόμορφο απεικονίζεται στον πίνακα 10 [64].



**Εικόνα 29:** ABO γονοτύπιση, θέσεις εκκινητών και μέγεθος προϊόντων. Τα σημεία κλειδιά των πολυμορφισμών υποδεικνύονται στις θέσεις 261, 802, 803 και 1059. Γράφοντας τα νούμερα με τη μορφή *italics* πάνω από το A1 διάγραμμα υποδεικνύεται οι νουκλεοτιδικές θέσεις στα όρια του εξωνίου 6 και 7. Ονόματα και σχετικές θέσεις για τις + αντιδράσεις των συναινετικών και ειδικών για τα αλληλόμορφα εκκινητών υποδεικνύονται επίσης. Η αντίστοιχη – αντίδραση των εκκινητών (δεν απεικονίζεται) τοποθετείται στην ίδια θέση και στην ίδια κατεύθυνση με την + αντίδραση του ομόλογού του. Παρόλα αυτά το 3’ τελικό νουκλεοτίδιο είναι συμπληρωματικό με την αλληλουχία του A1 αλληλομόρφου.



**Εικόνα 30:** ABO γονοτύπηση μέσω της ASPCR μεθόδου. Τα προϊόντα των + αντιδράσεων βρίσκονται στην πρώτη γραμμή κάθε ζευγαριού. Τα προϊόντα των – αντιδράσεων βρίσκονται στη δεύτερη γραμμή. Από τα αριστερά προς τα δεξιά οι γονότυποι  $A^1A^1$ ,  $O^1O^1$ , BB,  $BO^1$ ,  $A^1O^1$ ,  $O^1O^2$ ,  $A^1O^2$ ,  $A^2O^1$  και  $A^1B$  υποδεικνύονται.

Οι ABO ASPCR αντιδράσεις που απεικονίζονται στην εικόνα 29 εικονογραφούν τα προβλεπόμενα ενισχυμένα πρότυπα για τους  $A^1A^1$ ,  $O^1O^1$ , BB,  $BO^1$ ,  $A^1O^2$ ,  $O^1O^2$ ,  $A^1O^1$ ,  $A^2O^1$  και  $A^1B$  γονοτύπους. Η γονοτύπηση ενός  $A^1/A^1$  ομοζυγώτη (εικόνα 30, πανελ Α) διευκρινίζει την έμμεση αναγνώριση του  $A^1$  αλληλομόρφου. Η ‘+’ αντίδραση κατέχει μόνο τις 669bp του θετικού συναινετικού προϊόντος ελέγχου, ενώ η ‘-’ αντίδραση κατέχει όλα τα πιθανά ενισχυμένα προϊόντα. Η απουσία οποιοδήποτε προϊόντος ειδικού αλληλομόρφου ‘+’ αντίδρασης αποκλείει τα B,  $O^2$ ,  $A^2$  και  $O^1$  αλληλομόρφοι, αφήνοντας μόνο το  $A^1$ . Η παρουσία όλων των τεσσάρων προϊόντων ειδικών-αλληλομόρφων ‘-’ αντίδρασης εξυπηρετεί στο να επιβεβαιώσει την παρουσία ενός αλληλομόρφου που του λείπει κάθε ένας από τους B,  $O^2$ ,  $A^2$  και  $O^1$  –ειδικούς πολυμορφισμούς.

Με αυτή τη μέθοδο βρίσκουμε τους γονοτύπους των αλληλομόρφων  $A^2$ ,  $O^1$ ,  $O^2$ , και B, ανιχνεύοντας άμεσα την παρουσία των νουκλεοτιδικών αντικαταστάσεων που είναι πλήρως ή μερικώς υπεύθυνες για τον αντίστοιχο φαινότυπο. Μιας και δεν υπάρχει μία νουκλεοτιδική αντικατάσταση μοναδική για το  $A^1$  αλληλομόρφο, ταυτοποιείται έμμεσα μέσω του αποκλεισμού άλλων γνωστών αλληλομόρφων. Βασιζόμενοι στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες τους, το  $A^3$  (871 G-A, Asp-Asr),  $A^x$

(646T-A, Phe-Iso) και του καινούργιου ποικίλου αλληλομόρφου (526 C-G, Arg-Gly) που περιγράφεται από τον Stroncek et al (1995) θα ταυτοποιούντουσαν όλα ως  $A^1$  με αυτή τη μέθοδο[65]. Το  $O^1$  ποικίλο αλληλόμορφο (646 T-A, Phe-Iso; 681 G-A, silent; 771 C-T, silent; 829 G-A, silent ) που περιγράφεται από τους Olsson & Chester (1996) θα προσδιοριστεί ως ένα κοινό  $O^1$  αλληλόμορφο[66]. Παρομοίως, το  $B^3$  (1054 C-T, Arg-Trp), cisAB (467C-T, Pro-Leu; 803 G-C, Gly-Ala; 930 G-A, silent) και B(A) (297 A-G, silent; 796 C-A, Leu-Met; 803 G-C, Gly-Ala, 930 G-A, silent) θα παράγει πρότυπα αντίδρασης ίδια όπως του κοινού B αλληλομόρφου.

Εκατόν είκοσι δύο άτομα από την Καυκάσια φυλή ταυτοποιήθηκαν με αυτή τη μέθοδο. 98,4% ποσοστό ομοιότητας παρατηρήθηκε μεταξύ του πραγματικού γονότυπου και του προβλεπόμενου γονότυπου που βασίζεται στον φαινότυπο. Όλοι οι συνδυασμοί αλληλομόρφων παρατηρήθηκαν σε αυτή την ομάδα εκτός από τους  $O^2/O^2$ ,  $A^2/A^2$ ,  $A^2/O$  και  $A^2/B$ . αυτές οι παρατηρήσεις δεν είναι ασυνήθιστες δεδομένου της συχνότητας αυτών των αλληλομόρφων και το μέγεθος αυτής της ομάδας μελέτης. Οι συχνότητες των αλληλομόρφων  $A^1$ ,  $A^2$ ,  $O^1$ ,  $O^2$  και B σε αυτή την ομάδα μελέτης ήταν 18.8%, 1.7%, 67.1%, 1.7% και 10.8%, αντίστοιχα. Αυτά τα στοιχεία είναι συνεπή με αυτά που ανέφερε ο Gassner et al. (1996) όπου οι συχνότητες των  $A^1$ ,  $A^2$ ,  $O^1$ ,  $O^2$  και B αλληλομόρφων παρατηρήθηκαν ότι είναι 21.5%, 6.2%, 58.3%, 2.8% και 11.2%, σε 300 τυχαία άτομα καυκάσιας φυλής, αντίστοιχα [64].

Δύο δείγματα έδωσαν ασυνήθιστες πρότυπες αντιδράσεις που δεν θα προβλεμπότουσαν με βάση την ορολογική φαινοτύπιση. Το πρώτο από τα δείγματα είχε φαινότυπο O ομάδας με βάση ορολογικές μεθόδους αλλά είχε γονότυπο  $A^2/O^1$ . Αυτό το δείγμα παρήγαγε  $O^1$  και ‘μη  $O^1$ ’ προϊόντα, όπως και  $A^2$  και ‘μη  $A^2$ ’ προϊόντα. Ο συνδυασμός αυτών των ορολογικών και γενετικών αποτελεσμάτων υποδεικνύει την παρουσία ενός δυσλειτουργικού  $A^2$  αλληλομόρφου που δεν εκφράζεται.

Το δεύτερο ασύμφωνο δείγμα είχε επίσης φαινοτυπηθεί ως O ομάδα μέσω ορολογικών μεθόδων. Αυτό το δείγμα είχε γονοτυπηθεί ως  $O^1$ - θετικό και ‘μη  $O^1$ ’ αρνητικό. Αυτό είναι σύμφωνο με την  $O^1$  ομοζυγωτία. Ωστόσο, αυτό το δείγμα παράγει επίσης προϊόντα B ειδικά για το αλληλόμορφο. Ως εκ τούτου, αυτό το αλληλόμορφο κατέχει την ειδική έλλειψη στη θέση 261 που χαρακτηρίζει το  $O^1$

αλληλόμορφο καθώς και την ειδική για το B αλληλόμορφο κυτοσίνη στη θέση 803. Ο φαινότυπος αυτού του δείγματος είναι σύμφωνος με τον παρατηρούμενο γονότυπο. Αυτό το  $O^1$ -B υβριδικό αλληλόμορφο θα μπορούσε πιθανότατα να είναι το αποτέλεσμα ενός προηγούμενου συμβάν ανασυνδυασμού. Οι Gassner et al. (1996) ανέφεραν την ανίχνευση ενός παρόμοιου νέου  $O^1$  αλληλομόρφου,  $O^{1-A2}$ , που κατέχει την ειδική έλλειψη στη θέση 261 που χαρακτηρίζει το  $O^1$  αλληλόμορφο καθώς και την ειδική για το  $A^2$  αλληλόμορφο έλλειψη βάσης στη θέση 1059. Οι Watanabe et al (1997) επίσης αναφέρουν την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό ενός νέου A αλληλομόρφου,  $A^G$ , που φαίνεται να προέκυψε μέσω επιχιασμού μεταξύ του εξωνίου 6 του B αλληλομόρφου και του εξωνίου 7 του  $A^1$  αλληλομόρφου. Ωστόσο το  $A^G$  αλληλόμορφο κατέχει μια γουανίνη στη θέση 297 στη θέση μιας αδερίνης [64].

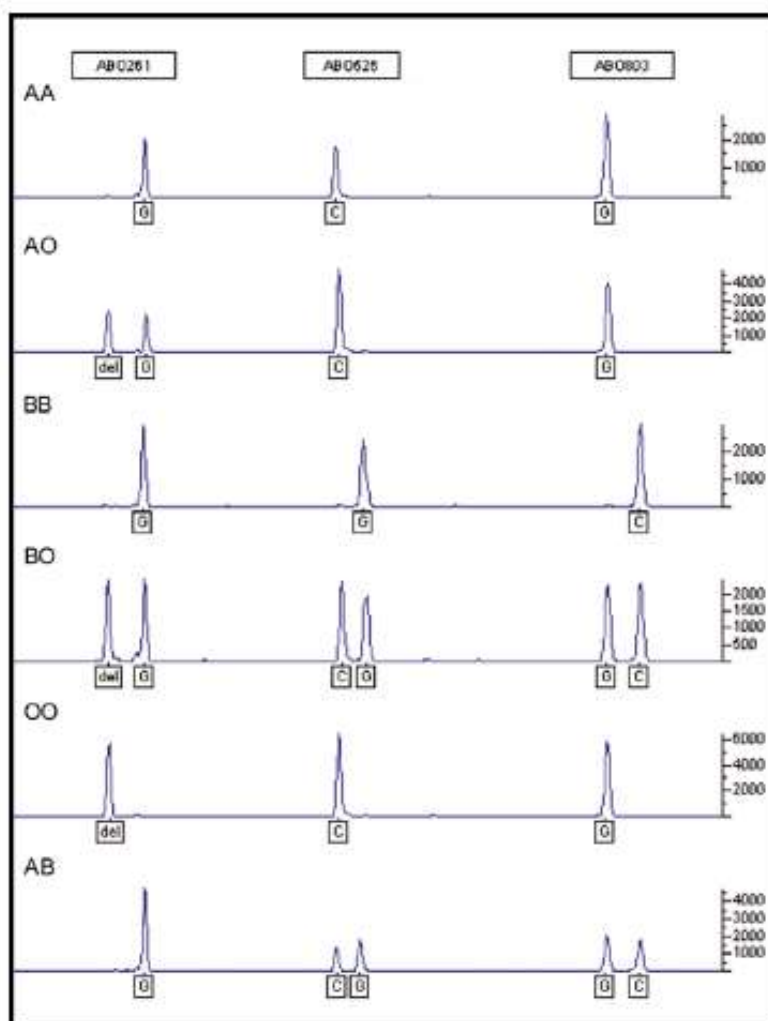
### **2.2.2 Άμεση και ταχεία πολλαπλή PCR μέθοδος για τον προσδιορισμό της ABO Ομάδας αίματος.**

Πολλές διαφορετικές μέθοδοι μοριακού προσδιορισμού του ABO αίματος έχουν αναφερθεί για τη συμπλήρωση της ρουτίνας του ορολογικού ελέγχου της ομάδας αίματος ABO. Ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι της ABO γονοτύπησης είναι συχνά χρονοβόρες και απαιτούν ένα αρχικό στάδιο απομόνωσης του DNA που απαιτεί τη χρήση δαπανηρών αντιδραστηρίων. Αναφέρουμε εδώ μια ταχεία μέθοδο προσδιορισμού του ABO γονότυπου που εξαλείφει την ανάγκη για την απομόνωση του DNA από φρέσκο αίμα, μαλλιά και λεκέδες σωματικού υγρού πριν από την PCR [67].

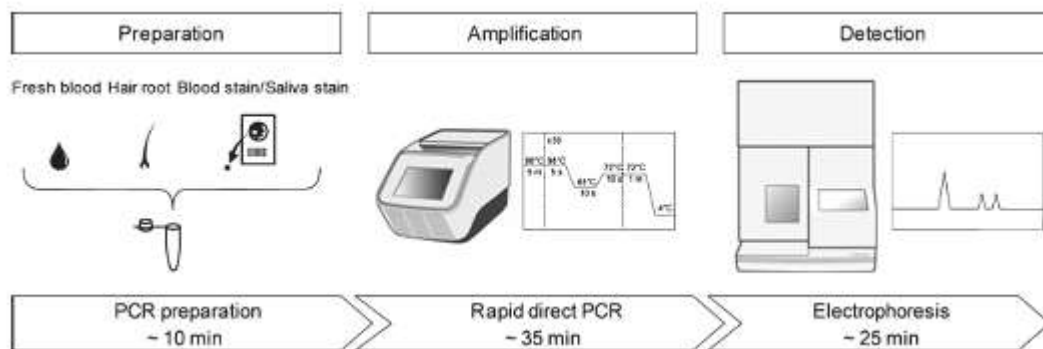
Το πολλαπλό σετ με εκκινητές ειδικούς για τα αλληλόμορφα που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μελέτη έδειξε ευαισθησία και ακρίβεια στον προσδιορισμό τριών SNPs (νουκλεοτίδια στις θέσεις 261, 526 και 803) για την ταυτοποίηση πέντε αλληλομόρφων ( $A$ ,  $B$ ,  $OO^1/ OO^2$ ,  $OO^3$ , και  $cis\text{-}ABO^1$ ) (Εικ. 31). Παρήγαγε αξιόπιστα αποτελέσματα όταν η ποσότητα του DNA ήταν τόσο χαμηλή

όσο 60 pg, χωρίς πτώση αλληλόμορφων ή drop-out. Η ακρίβεια της διάκρισης του γονότυπου επιβεβαιώθηκε με συμφωνία μεταξύ της ABO γονοτύπισης χρησιμοποιώντας ένα πολλαπλό σετ εκκινητή ειδικό για τα αλληλόμορφα και τα προηγούμενα αποτελέσματα αλληλούχισης 100 δειγμάτων γονιδιωματικού DNA 23, 9, 16, 30, και 11 δείγματα για AA, AO, BB, BO, OO, και AB ομάδα αίματος, αντίστοιχα) [68]. Οι αρνητικοί έλεγχοι και τα τυφλά αντιδραστήρια δεν έδειξαν κανένα προϊόν PCR.

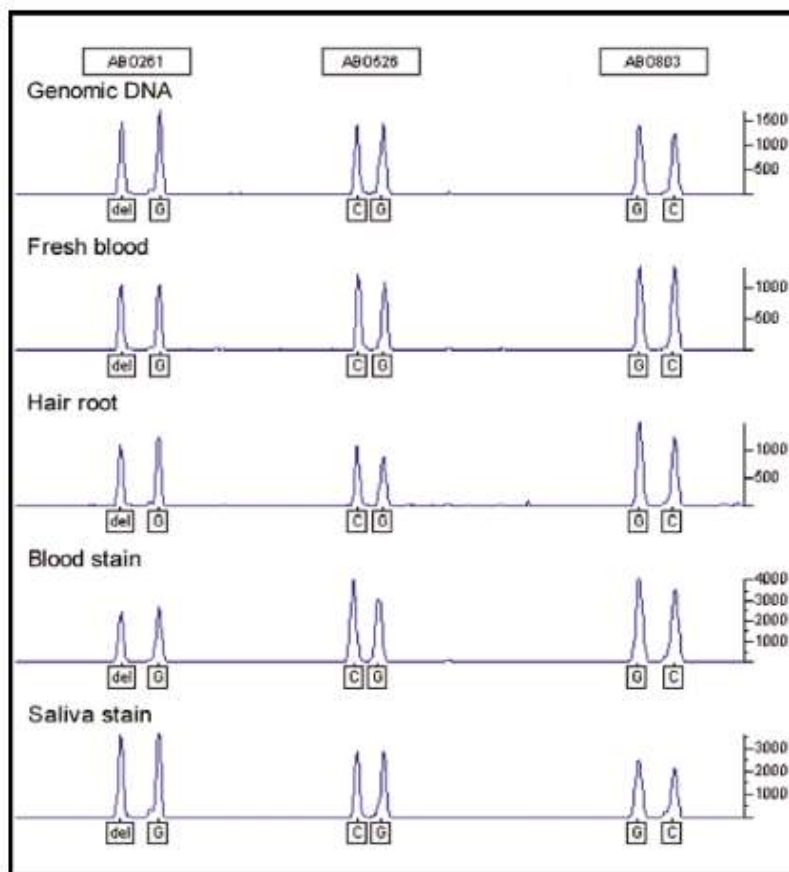
Επιπλέον, η ABO γονοτύπιση που περιγράφεται εδώ, η οποία χρησιμοποιεί ένα γρήγορο PCR όργανο και μία βελτιστοποιημένη πολυμεράση, καθιστά δυνατό τον άμεση χαρακτηρισμό του αίματος, τις τρίχες, και τα δείγματα σιέλου χωρίς προηγούμενη απομόνωση DNA σε περίπου 70 λεπτά (Εικ. 32). Μόλις 1 μl του αίματος, μία ρίζα της τρίχας, ή λεκές από αίμα 1,2-mm-διαμέτρου ή λεκές από σάλιο είναι επαρκής για τον ακριβή προσδιορισμό του γονότυπου ABO με καλές αναλογίες ύψος κορυφής ετεροζυγωτών και χωρίς να συμβαίνει εγκατάλειψη καμίας θέσης (Εικ. 33).



**Εικόνα 31:** Το ηλεκτροφερόγραμμα έξι κοινών ABO γονότυπων σε έναν κορεάτικο πληθυσμό: AA, AO, BB, BO, OO, και AB. Χρησιμοποιώντας εκκινητές ειδικούς για ζεύγη αλληλομόρφων που έχουν τροποποιηθεί στο άκρο 5A, η πολλαπλή PCR στο σύνολο αυτής της μελέτης διευκολύνει την ABO γονοτύπιση επιτρέποντας ταυτόχρονα διάφορα αλληλόμορφα την παραγωγή ενισχυμένων προϊόντων διαφορετικών μεγεθών. Η έλλειψη νουκλεοτιδίου στη θέση 261 υποδεικνύεται από την ένδειξη " del ".



**Εικόνα 32:** Διάγραμμα που δείχνει το ταχύ και άμεσο πρωτόκολλο PCR για τον ABO προσδιορισμό της ομάδας αίματος από τη συλλογή του δείγματος για ηλεκτροφορησιογράφημα.



**Εικόνα 33:** Αντιπροσωπευτικό ηλεκτροφερόγραμμα ταχείας και άμεσης PCR για την ABO γονοτύπηση με φρέσκες κηλίδες αίματος, μαλλιά και σωματικά υγρά. Αυτό το πρωτόκολλο ABO γονοτύπησης επιτρέπει τον άμεσο χαρακτηρισμό του αίματος, τρίχες, και τα δείγματα σιέλου χρησιμοποιώντας μόνο 1  $\mu$ l του αίματος, μια ρίζα της τρίχας, ή μια γροθιά 1,2 mm, διάμετρος του αίματος ή λεκέ από σάλιο, χωρίς προηγούμενη απομόνωση του DNA, σε περίπου 70 λεπτά, με καλή θέση στη θέση ισορροπίας, καλές αναλογίες ύψους κορυφής ετεροζυγωτών, και καμία θέση εγκατάλειψης. [67]

### 2.2.3. Εφαρμογή της πραγματικού χρόνου PCR μεθόδου και ανάλυσης της καμπύλης τήξεως για την ανίχνευση των Ael και Bel ομάδων αίματος.

Πέραν των κανονικών επιπέδων έκφρασης των ABO αντιγόνων, τα A<sup>el</sup> και B<sup>el</sup> αντιπροσωπεύουν τους δύο κύριους τύπους αίματος που έχουν ασθενή έκφραση των αντιγόνων A ή B στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Λόγω του γεγονότος ότι ο προσδιορισμός A<sup>el</sup> και B<sup>el</sup> με συμβατικές ορολογικές μεθόδους είναι χρονοβόρος και μερικές φορές δίνει ψευδώς θετικά και ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, είναι αναγκαίο να αναπτυχθεί μια πρόσθετη τεχνική για τον προσδιορισμό των A<sup>el</sup> ατόμων. Μέσα από γενετική ανάλυση έχουμε ήδη εντοπίσει A<sup>el</sup> άτομα να διαθέτουν ένα αλληλόμορφο με IVS6 + 5G-A μετάλλαξη (Transfusion 2003;43:1138-1144) και B<sup>el</sup> άτομα να διαθέτουν ένα γονίδιο B με 502C-T μετάλλαξη στην Ταϊβάν (Vox Sanguinis 2003; 85: 216-220). Ως εκ τούτου, σε αυτή τη μελέτη προσδιορισμού του γονότυπου, αναπτύχθηκε η μέθοδος real-time PCR για να διευκολυνθεί η ανίχνευση του A<sup>el</sup> και B<sup>el</sup>. Για τον προσδιορισμό του γονότυπου του A<sup>el</sup> και B<sup>el</sup>, η περιοχή των μεταλλάξεων ενισχύθηκε με PCR και υποβλήθηκε στη μέθοδο real-time PCR, LightCycler (LC) με τη χρήση σημασμένου ανιχνευτή υβριδοποίησης LC Red640. Ανάλυση της καμπύλης τήξεως διεξήχθη για να προσδιοριστεί η θερμοκρασία τήξης T<sub>m</sub> που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του γονότυπου A<sup>el</sup> και B<sup>el</sup> ομάδας αίματος. Για τον A γονότυπο, η καμπύλη τήξης του πρότυπου ελέγχου εμφανίζεται ως μία κορυφή στα 59.19 ± 0.07 ° C (μέση τιμή ± SE), και του A<sup>el</sup> εμφανίζεται ως 2 κορυφές στα 59,21 ± 0,07 ° C και 64,39 ± 0,07 ° C, που αντιστοιχεί στα O και A<sup>el</sup> αλληλόμορφα, αντίστοιχα. Για τον B γονότυπο, η καμπύλη τήξης του πρότυπου ελέγχου εμφανίζεται ως μία κορυφή στα 67.99 ± 0.11 ° C και του B<sup>el</sup> εμφανίζεται ως 2 κορυφές στα 59,99 ± 0,12 ° C και 68,1 ± 0,13 ° C, που αντιστοιχούν στα B<sup>el</sup> και O αλληλόμορφα, αντίστοιχα. Αυτή η μέθοδος γονοτύπησης δείχθηκε να είναι ακριβείς, με βάση την αυτοματοποιημένη αλληλούχιση των ενισχυμένων με PCR προϊόντων. Χρειάζονται μόνο 90 λεπτά για να εκτελεστεί αυτή η γονοτυπική δοκιμή. Ο εντοπισμός των A<sup>el</sup> και B<sup>el</sup> ομάδων αίματος ύστερα από τον συνδυασμό της LC-PCR και της αναλύσεως καμπύλης τήξης είναι μια γρήγορη, αξιόπιστη και εύκολη μέθοδο[69].

Επιπλέον ως προς τις κοινές ABO ομάδες αίματος, έχουν αναγνωριστεί διακριτοί τύποι αίματος με μια ασθενή έκφραση των αντιγόνων A ή B στην επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC) και έχουν οριστεί ως  $A^3$ ,  $A^x$ ,  $A^{el}$ ,  $B^3$ ,  $B^x$ ,  $B^{el}$ , cis-AB, και B (A), αντιστοίχως [70, 71]. Πληθυσμιακή μελέτη έχει αποκαλύψει ότι οι  $A^{el}$  και  $B^{el}$  είναι οι 2 πιο μεγάλοι αδύναμοι τύποι των A και B ομάδων αίματος (weak A, weak B), αντίστοιχα, στην Ταϊβάν [72]. Αυτοί οι τύποι αίματος προσδιορίζονται γενικά από την έκλυση απορρόφησης και δοκιμής σάλιου. Ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι είναι χρονοβόρες και τα αποτελέσματα είναι μερικές φορές μπερδεμένα. Για παράδειγμα, ψευδώς θετικά αποτελέσματα μπορεί να ληφθούν λόγω ύπαρξης κρυστοσυγκολλητινών, βακτηριακών συσσωματωμάτων, ή λόγω της φυγοκέντρωσης. Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα μπορεί να προκληθούν από χαμηλό τίτλο του αντιορού ή λόγω των ανώριμων ερυθρών αιμοσφαιρίων ενός νεογέννητου. Ως εκ τούτου, μια εναλλακτική προσέγγιση είναι απαραίτητη για τον προσδιορισμό των  $A^{el}$  και  $B^{el}$  ατόμων.

Μεταξύ αυτών των μεθόδων, η τεχνική real-time PCR έχει αποδειχθεί χρήσιμη στην διάκριση των αλληλομόρφων. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση ενός ανιχνευτή TaqMan ειδικού για το αλληλόμορφο [73], και ανιχνευτή υβριδοποίησης, ακολουθούμενο από ειδική ανάλυση της συμπεριφοράς τήξης του αλληλομόρφου [74]. Η παρακολούθηση του φθορισμού χρησιμοποιώντας ανιχνευτές υβριδοποίησης βασίζεται στην αρχή ότι ένα σήμα φθορισμού παράγεται εάν η μεταφορά ενέργειας του συντονισμού φθορισμού (FRET) εμφανίζεται μεταξύ δύο γειτονικών φθοροφόρων [75]. Αυτή η μέθοδος ανίχνευσης επιτρέπει την παρακολούθηση της έντασης του σήματος FRET, η οποία είναι ανάλογη της ποσότητας του ειδικού προϊόντος της PCR που παράγεται. Πιο σημαντικό είναι το γεγονός ότι η γονοτύπηση χρησιμοποιώντας 2 ανιχνευτές υβριδισμού είναι δυνατή με έναν ανιχνευτή ανίχνευσης που καλύπτει την πολυμορφική θέση και έναν ανιχνευτή άγκυρα που αναγνωρίζει μία γειτονική αλληλουχία, αφού πολυμορφικά αλληλόμορφα μπορούν να διακριθούν από τη θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ) του ανιχνευτή ανίχνευσης. Συνεχής έλεγχος φθορισμού της αντίδρασης καθώς η θερμοκρασία  $T_m$  αυξάνεται από την αναδίπλωση και επιμήκυνση των αλυσίδων στη μετουσίωσή τους με αποτέλεσμα μια απότομη μείωση του φθορισμού στην θερμοκρασία στην οποία οι ανιχνευτές ανίχνευσης διασπώνται από τη πρότυπη περιοχή. Μία αλλαγή βάσεως που προκαλείται από τον πολυμορφισμό του ABO συστήματος έχει ως αποτέλεσμα μια μείωση του  $T_m$  του ανιχνευτή(ή ιχνηλάτη) ανίχνευσης που μπορεί να διακριθεί

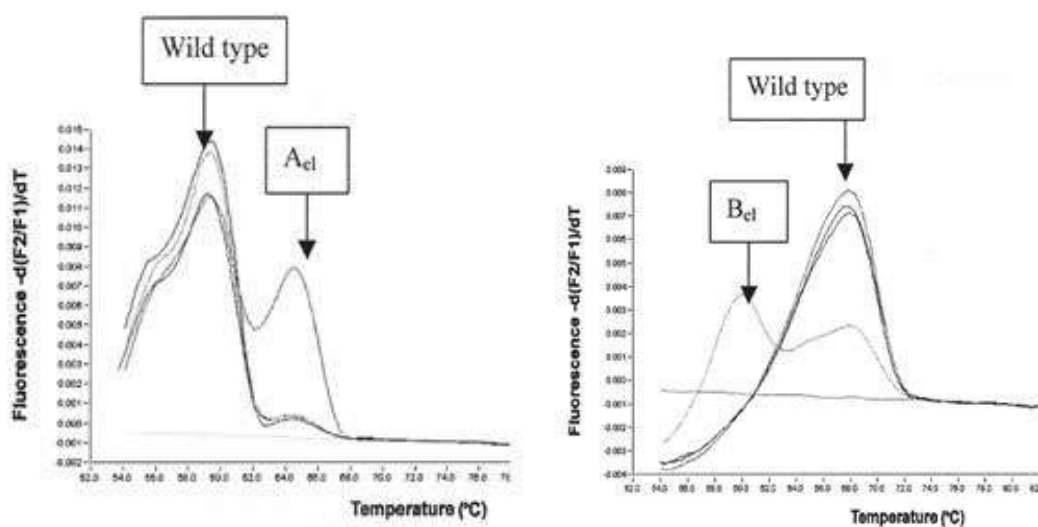
εύκολα χρησιμοποιώντας το όργανο LightCycler. Σε αυτή τη μελέτη, περιγράφουμε την ανάπτυξη ενός ανιχνευτή υβριδισμού που βασίζεται στην τεχνική real-time PCR για την ανίχνευση των  $A^{el}$  και  $B^{el}$  γονοτύπων. Η real-time PCR πραγματοποιήθηκε με τον LightCycler θερμικό ανακυκλωτή και η συμπεριφορά τήξης του ειδικού για το αλληλόμορφο ανιχνευτή υβριδισμού σημασμένο με φθοροφόρο, χρησιμοποιήθηκε για να ανιχνεύσει  $A^{el}$  και  $B^{el}$  ειδικούς γονότυπους. Η μέθοδος αυτή αξιολογείται από κλινικά διαθέσιμα δείγματα. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο αυτή θα διευκολύνθει ο εντοπισμός των ατόμων με την  $A^{el}$  ή  $B^{el}$  ομάδα αίματος και θα μπορούσαν να ενσωματωθούν στη ρουτίνα προσδιορισμού των σπάνιων ομάδων αίματος σε κλινικά διαγνωστικά εργαστήρια. Οι  $A^{el}$  και  $B^{el}$  ομάδες αίματος αντιστοιχούν στο 80.03% και 100% των ασθενών A και ασθενών B ομάδων αίματος ατόμων από την Ταιβάν, αντίστοιχα [69].

Διάφορες μέθοδοι που βασίζονται στην PCR, συμπεριλαμβανομένων των multiplex SSP [76], RFLP [77-79], και SSCP [80-83] έχουν αναφερθεί για τον προσδιορισμό του γονότυπου των ABO ομάδων αίματος. Στην παρούσα μελέτη, αναφέρουμε μια νέα μέθοδο για τον προσδιορισμό του αίματος των πιθανών  $A^{el}$  και  $B^{el}$  άτομα. Αυτή η μέθοδος έχει αρκετά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τις ορολογικές μεθόδους. Η τεχνική real-time PCR είναι ακριβέστερη και σαφώς αποκαλύπτεται αυτό από την ανάλυση του προφίλ της καμπύλης τήξης. Σε αντίθεση, η ορολογική μέθοδος προσδιορισμού της ομάδας αίματος συνήθως εξαρτάται από την αντικειμενική παρατήρηση των συγκολλημένων ερυθρών (RBC) και μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένη ανάγνωση της ομάδας αίματος. Η real-time PCR έχει καλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα συνήθως <1 ml περιφερικού αίματος απαιτείται για τη τεχνική αυτή. Μιας και ο προσδιορισμός των ομάδων αίματος  $A^{el}$  και  $B^{el}$  επιτυγχάνεται εντός 90 λεπτών μετά την εκχύλιση του DNA, και έτσι αποτελεί επίσης μια γρήγορη μέθοδο [69].

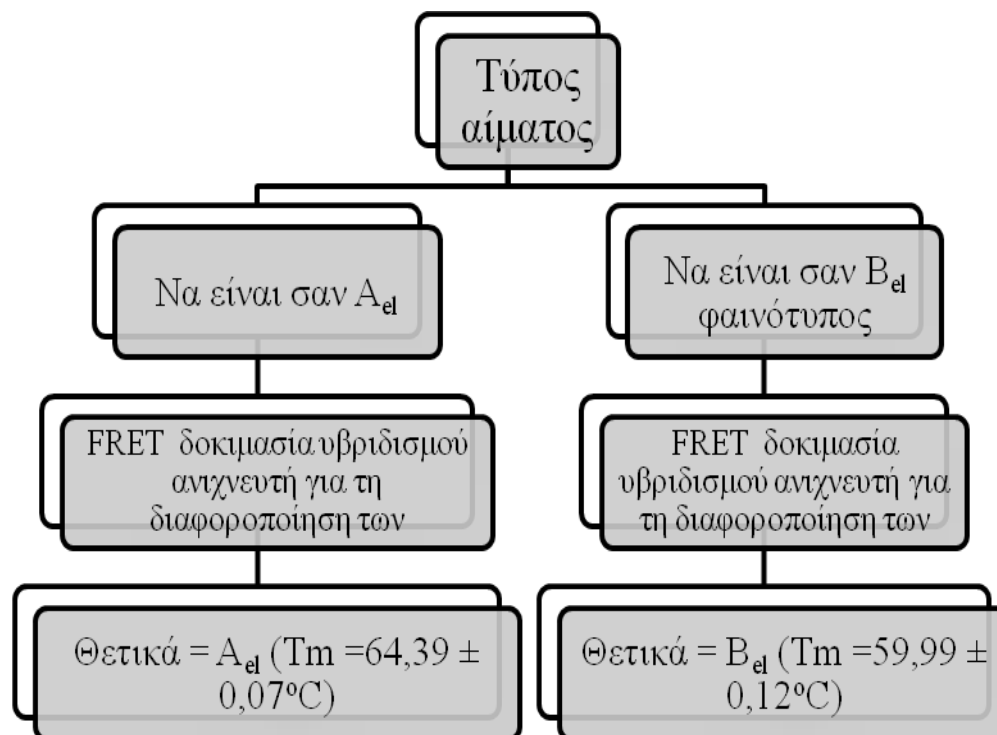
Σημειώνεται ότι οι γονότυποι  $A^{el}$  και  $B^{el}$  είναι διαφορετικοί σε διάφορες περιοχές και χώρες. Για παράδειγμα, δύο διαφορετικές μοριακές μεταβολές, στη θέση 804 προσθήκη μίας βάσης G και στη θέση 646 νουκλεοτιδική αντικατάσταση T→A στο A αλληλόμορφο, έχουν προηγουμένως αναφερθεί ότι είναι υπεύθυνες για τον  $A^{el}$  φαινότυπο [84, 85]. Μεταλλάξεις στις θέσεις 641 T→G και 669 G→T, αντίστοιχα, έχουν αναφερθεί για το αλληλόμορφο B για το φαινότυπο  $B^{el}$  σε άλλες φυλές [40]. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητο και για όλους τους άλλους να διατυπωθεί μια παρόμοια

μέθοδος προσδιορισμού του γονότυπου ανάλογα με την περιφερειακή μετάλλαξη που εμφανίζεται για τις A<sup>el</sup> και B<sup>el</sup> ομάδες αίματος.

Οι αναλύσεις μας δείχνουν ότι όλα τα άτομα με A<sup>el</sup> φαινότυπο στην Ταϊβάν έχουν ένα αλληλόμορφο με IVS6 + 5G→A μετάλλαξη, ενώ όλα τα άτομα με B<sup>el</sup> φαινότυπο έχουν ένα γονίδιο B με τη μετάλλαξη 502C→T. Ως εκ τούτου, προτείνουμε ένα νέο διάγραμμα ροής εργασιών για τον προσδιορισμό σπάνιων ομάδων αίματος (Εικ. 35). Πρώτον, μία ορολογική μέθοδος που θα χρησιμοποιείται για την ταχεία διαλογή ως προς την παρουσία του αντιγόνου και του αντισώματος ABO. Όταν ληφθεί ένα αποτέλεσμα όπου ο προσδιορισμός της ευθείας ομάδα αίματος είναι O και η ανάστροφη ομάδα αίματος δίνει A ή B, απομονώνουμε γονιδιωματικό DNA από το περιφερικό αίμα για να εφαρμόσουμε τις τεχνικές real-time PCR και ανάλυση καμπύλης τήξεως και να προσδιορίσουμε αν το υπό δοκιμή υποκείμενο έχει την A<sup>el</sup> ή την B<sup>el</sup> ομάδα αίματος.



Εικόνα 34: Ανάλυση καμπύλης τήξεως για την ανίχνευση Ael και Bel ομάδων αίματος.



**Εικόνα 35:** Διάγραμμα ροής εργασίας που μπορεί να αντικαταστήσει την δοκιμασία απορρόφησης-έκλυσης, η οποία είναι χρονοβόρα και λιγότερο ακριβείς.

### **2.3 Ανάλυση γενωμικού DNA σε Ιαπωνικά άτομα, εύρεση αλληλόμορφων του ABO συστήματος:**

Σε μια μελέτη των Tokunaga et al., έκαναν ανάλυση του γενωμικού DNA που λαμβάνεται από ιαπωνικά άτομα που διαθέτουν παραλλαγή ABO φαινοτύπων περιλαμβανομένων των A<sub>2</sub>, A<sub>x</sub>, A<sub>el</sub>, cis-AB, B<sub>x</sub>, και B<sub>el</sub>. Με την μέθοδο PCR-SSCP και την ανάλυση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων, εντοπίσανε 11 διαφορετικά αλληλόμορφα. Ανάλυση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των υπεύθυνων αλληλόμορφων για τους διαφορετικούς φαινότυπους έδειξε ότι τα κατάλοιπα των αμινοξέων στις θέσεις 266 και 268 μπορεί να είναι ζωτικής σημασίας για την ειδικότητα της τρανσφεράσης, ενώ εκείνα στις θέσεις 214, 216, 223, 291, και 352 μπορεί να είναι κρίσιμα για το επίπεδο δραστηριότητας[40]. Εννέα από τα 11 αλληλόμορφα, υπεύθυνα για τους A<sub>2</sub>, A<sub>x</sub>, A<sub>el</sub>, cis-AB, B<sub>x</sub>, και B<sub>el</sub> φαινοτύπους, θεωρήθηκαν ότι πρέπει να δημιουργούνται από τα κοινά αλληλόμορφα ABO από μεταλλάξεις νουκλεοτιδίων όπως μη-συνώνημες υποκαταστάσεις, διαγραφή ή παρεμβολή. Δύο άλλα αλληλόμορφα, υπεύθυνα για τους A<sub>2</sub> και A, φαινοτύπους, μπορεί να προήλθαν από ανασυνδυασμό, η μετατροπή του γονιδίου, όπως γεγονότα ή

Τα στοιχεία αυτής της μελέτης δείχνουν ότι διαφορετικά αλληλόμορφα θα μπορούσαν να προκαλέσουν την ίδια παραλλαγή ABO φαινοτύπων, και ότι αυτά τα αλληλόμορφα δεν χρειάζεται απαραίτητα να ανήκουν σε μια ενιαία εξελικτική γραμμή [40].

Σε μία προηγούμενη μελέτη, προσδιόρισαν τις αλληλουχίες 13 διαφορετικών αλληλομόρφων που ανιχνεύθηκαν σε 262 υγιείς Ιάπωνες ιδιώτες που έχουν κοινούς ABO φαινοτύπους και διευκρίνισαν την ύπαρξη αρκετών αλληλομόρφων υπεύθυνων για μονούς φαινοτύπους. Αυτά τα αλληλόμορφα ταξινομήθηκαν σε τρεις μεγάλες συγγενικές σειρές υπο την άποψη της εξελικτικής τους σχέσεις. Επιπλέον, με τη μέθοδο PCR-SSCP, μπόρεσαν να εντοπίσουν τα κοινά αλληλόμορφα ABO καθώς και να ανιχνεύσουν άγνωστα ABO αλληλόμορφα. Στην παρούσα εργασία τους, έχουν επεκτείνει τη μελέτη τους σε ποικίλους ABO φαινότυπους. Αναφέρουν εδώ οκτώ νέα αλληλόμορφα γνωστής αλληλουχίας. Τα αποτελέσματα τους επέτρεψαν να προβλέψουν αμινοξικά κατάλοιπα ζωτικής σημασίας για την εξειδίκευση και το επίπεδο δραστηριότητας των τρανσφερασών στην καταλυτική περιοχή. Οι εξελικτικές γραμμές αυτών των αλληλομόρφων και άλλων ABO αλληλομόρφων συζητήθηκαν επίσης [40].

Από αυτά τα 11 αλληλόμορφα, τα 8 από αυτά ήταν νέα και αλληλουχίσθηκαν πρόσφατα. Τα 4 αλληλόμορφα από αυτά ανήκαν στον  $A^2$  φαινότυπο και είναι τα ABO\*A105, ABO\*A106, ABO\*A107, και ABO\*R101 [με συχνότητα εμφάνισης 5%, 53%, 37%, και 5% αντίστοιχα]. Δύο αλληλόμορφα ανήκαν στον  $A^{el}$  φαινότυπο τα ABO\*A109 και ABO\*A110, και τα άλλα δύο αλληλόμορφα στον  $B^{el}$  φαινότυπο τα ABO\*B105 και ABO\*B106 [40].

Σε σύγκριση με την νουκλεοτιδική αλληλουχία του αλληλόμορφου ABO\*A101 που εκφράζεται από τον πιο συχνό φαινότυπο τον  $A^1$ , υπήρχαν ορισμένες διαφορές, διαφορετικές για το κάθε αλληλόμορφο. Πιο συγκεκριμένα: Το ABO\*A105, έχει μια μη-συνώνυμη αντικατάσταση, στο κωδικόνιο 156, όπου το CCG (που κωδικοποιεί Pro) μετατρέπεται σε CTD (που κωδικοποιεί Leu), και μία έλλειψη βάσης (μία από τις κυτοσίνες στο διάστημα 1059-1061 βάσεις). Τα αλληλόμορφα ABO\*106 και \*A107 έχουν από μία αντικατάσταση βάσης (C σε T και C σε G, αντίστοιχα) στις θέσεις 1054, με αποτέλεσμα μια αλλαγή του αμινοξέως στη θέση 352 (Arg σε Trp και Arg σε Gly, αντίστοιχα). Το ABO\*R101 έχει έξι

διαφορετικά νουκλεοτίδια στις θέσεις 297, 526, 657, 703, 771 και 829, με αποτέλεσμα τρεις αμινοξικές αντικαταστάσεις στις θέσεις 176, 235 και 277[40].

Το ABO\*C101 αλληλόμορφο, που είναι υπεύθυνο για τον cisAB φαινότυπο έχει δύο μη-συνώνημες αντικαταστάσεις στα κωδικόνια 156 (CCG-Pro σε CTG-Leu) και 268 (GGG-Gly σε GCG-Ala). Το ABO\*A108 αλληλόμορφο, υπεύθυνο για τον Ax φαινότυπο έχει μια μη-συνώνημη αντικατάσταση στο κωδικόνιο 216 (TTC-Phe σε ATC-Ile). Το ABO\*A109 αλληλόμορφο, υπεύθυνο για τον Ael φαινότυπο, έχει μια προσθήκη νουκλεοτιδικής βάσης (G) στις επαναλαμβανόμενες γουανίνες στη περιοχή 798-804 με αποτέλεσμα ένα διαφορετικό πλαίσιο ανάγνωσης. Το ABO\*A110 αλληλόμορφο έχει τρεις νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις, στις θέσεις 467 (C σε T), 646 (T σε A) και 681 (G σε A), με αποτέλεσμα δύο αμινοξικές αντικαταστάσεις στις θέσεις 156 (Phe σε Leu) και 216(Phe σε Ile)[40].

Και τα τρία ποικίλα αλληλόμορφα της B ομάδας αίματος (ABO\*B104, \*B105, και \*B106) καθώς και το κυρίως αλληλόμορφο ABO\*B101, μοιράζονται επτά νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις, στις θέσεις 297, 526, 657, 703, 796, 803, και 930. Επιπλέον, το ABO\*B104 αλληλόμορφο, υπεύθυνο για τον Bx φαινότυπο, έχει μία μη-συνώνημη νουκλεοτιδική αντικατάσταση στο κωδικόνιο 291 (GAC που κωδικοποιεί Asp σε AAC που κωδικοποιεί Asn). Τα ABO\*B105 και \*B106 αλληλόμορφα, υπεύθυνα για τον Bel φαινότυπο επίσης έχουν μία μη-συνώνημη νουκλεοτιδική αντικατάσταση στο κωδικόνιο 214 (ATG που κωδικοποιεί Met σε AGG που κωδικοποιεί Arg), αντίστοιχα, σε σύγκριση με το ABO\*A101[40].

- Υλικά και Μέθοδοι

AB0 ομαδοποίηση. Οι AB0 φαινότυποι περιλαμβανομένων των A<sub>2</sub>, A<sub>x</sub>, A<sub>el</sub>, B<sub>x</sub>, B<sub>el</sub>, και cis-AB προσδιορίστηκαν με δοκιμές συγκόλλησης και προσρόφησης-έκλουσης χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού αντι-A και αντι-B IgM τύπου (Ortho, Raritan, NJ), ανθρώπινα πολυκλωνικά αντι-A, αντι-B (Dade, Miami, E), και αντι-A, B αντισώματα (Ortho) και φυτικές λεκτίνες (Dolichos Bijorus για αντι-A, Ulex europaeus για αντι-H, Sanko Junyaku Co, Tokyo, Japan). Οι φαινότυποι A<sub>1</sub> και A<sub>2</sub> διακρίθηκαν μεταξύ τους με αντι-A<sub>1</sub>: ισχυρή συγκόλληση (4 +) για A, και όχι συγκόλληση (0) για την A<sub>2</sub>. Οι αδύναμοι φαινότυποι A<sub>x</sub>, και A<sub>el</sub>, προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό αντι-A και πολυκλωνικά αντι-A, B αντισώματα, αδύναμη συγκόλληση (1-2 +) για A<sub>x</sub> και 0 για A<sub>el</sub> και η παρουσία των καθοριστικών παραγόντων A επί των A<sub>el</sub> ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs) δείχθηκε χρησιμοποιώντας

μια τεχνική προσρόφησης-έκλωσης με πολυκλωνικά αντισώματα αντι-A. Οι φαινότυποι B<sub>x</sub> και B<sub>el</sub>, προσδιορίστηκαν με τον ίδιο τρόπο χρησιμοποιώντας αντι-B και αντι-A, B αντισώματα. Τα cis-AB θετικά άτομα ήταν επιλεγμένα από δύο οικογένειες. Συνολικά, επιλέξαμε 19 A<sub>2</sub>, 3 A<sub>x</sub>, 4 A<sub>el</sub>, 2 cis-AB, 1 B<sub>x</sub>, και 2 B<sub>el</sub>, θετικά άτομα μεταξύ υγιών ατόμων της Ιαπωνίας. Τα επίπεδα δραστηριότητας της τρανσφεράσης στον ορό προσδιορίστηκαν με την εκτίμηση του αντεστραμμένου βαθμού συγκόλλησης της ομάδας O RBCs σε A ή B ερυθροκύτταρα χρησιμοποιώντας τα μονοκλωνικά αντισώματα αντι-A και αντι-B[40].

- Διάκριση AB0 αλληλομόρφων.

Γενωμικό DNA απομονώθηκε από δείγματα περιφερικού αίματος των παραπάνω ατόμων με τυπική εκχύλιση φαινόλη-χλωροφόρμιο. Οι αναλύσεις PCR-SSCP, group specific PCRs, και άμεση αλληλούχιση, διεξήχθησαν όπως περιγράφεται προηγουμένως. Τα εξώνια 6 και 7 του ABO γονιδίου, τα οποία κωδικοποιούν το μεγαλύτερο μέρος του καταλυτικού τομέα της τρανσφεράσης, ενισχύθηκαν χρησιμοποιώντας τέσσερα ζεύγη εκκινητών υπό κατάλληλες συνθήκες και τα τέσσερα κομμάτια που λαμβάνονται (I-IV) υποβλήθηκαν σε ανάλυση SSCP για την ανίχνευση διαφορών στην αλληλουχία. SSCP ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ένα πήκτωμα 12.5% έως 15% πολυακρυλαμίδιου(ακρυλαμίδιο: δισακρυλαμίδιο = 49:1) με ή χωρίς 5% v/v γλυκερόλη. Εν συντομία, 1 μL του ενισχυμένου διαλύματος DNA αναμίχθηκε με 7 μL του αποδιατακτικού διαλύματος (95% φορμαμίδιο, 20 mmol/L EDTA, 0.05% μπλε βρωμοφαινόλης, και 0.05% ξυλόλιο cyanol FF), θερμάνθηκε στους 95 ° C για 5 λεπτά, και αμέσως ψύξη επί πάγου, και 1 μL του μίγματος υποβλήθηκε σε ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδιου στους 12° C έως 30 ° C. Τα διαχωρισμένα μονόκλωνα DNA θραύσματα στο πήκτωμα γίνονται ορατές με βαφή αργύρου (Daiichi Pure Chemicals, Tokyo, Japan). Ομάδα-ειδικών PCRs διεξήχθησαν στη συνέχεια για την παρασκευή των προτύπων DNA για ανάλυση αλληλουχίας. Τα DNAs που παρασκευάστηκαν αλληλουχήθηκαν άμεσα τουλάχιστον δύο φορές για κάθε κατεύθυνση με μία μέθοδο προσδιορισμού κυκλικής αλληλουχίας με τους ίδιους εκκινητές όπως αυτοί που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR-SSCP χρησιμοποιώντας αυτοματοποιημένο αλληλουχητή DNA (373A.: Applied Biosystems Foster City, CA). Τα παρατηρούμενα αλληλόμορφα είχαν προσωρινά ονομαστεί σύμφωνα με τις

κατευθυντήριες γραμμές για την ονοματολογία του ανθρώπινου γονιδίου. Όταν ένα προσδιοριζόμενο αλληλόμορφο υποτίθεται ότι δημιουργείτε απο ανασυνδυασμό, το R χρησιμοποιήθηκε ως το πρώτο γράμμα του ονόματος του αλληλομόρφου. Στην περίπτωση ενός αλληλίου υπεύθυνου για τον φαινότυπο cis-AB, το γράμμα C χρησιμοποιήθηκε [40].

- Αντιστοίχιση φαινότυπου με δραστικότητα τρανσφεράσης

Οι διαφορές των αμινοξέων της τρανσφεράσης για κάθε διαφορετικό φαινότυπο συνάγεται στην παρούσα ανάλυση αλληλουχίας νουκλεοτιδίων και της προηγούμενης αναφοράς και συνοψίζονται στον πίνακα 3. Επειδή η ποσότητα των A και B παραγόντων στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων, ταξινομείται με βάση την εξής ποσοτική σειρά  $A1 > A2 > A3 > Ax > Ael$  ή  $B > B3 > Bx > Bel$ , είναι αναμενόμενο ότι τα πιο σημαντικά αμινοξέα για τα επίπεδα της ενζυματικής δραστηριότητας βρίσκονται στις θέσεις 214 (Met ή Arg), 216 (Phe ή Ile) και 223 (Glu ή Asp). Η αντικατάσταση των αμινοξέων στις θέσεις 291 (Asp σε Asn) και 352 (Arg σε Gly/Trp) μπορεί επίσης να οδηγήσουν σε μείωση των επιπέδων δραστικότητας, αλλά το αμινοξύ που αλλάζει στην θέση 156 (Pro σε Leu) και 277 (Val σε Met) μπορεί να έχει μικρή επίδραση. Τα επίπεδα δραστικότητας της τρανσφεράσης του ορού αυτών των διαφορετικών δειγμάτων (πίνακας 11) υποστηρίζουν την παραπάνω προβλεψη[40].

**Πίνακας 11:** Σχέση μεταξύ των αμινοξικών αλληλουχιών των τρανσφερασών και των παραγόμενων ABO χαρακτήρων που προκύπτουν από τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες.

| ABO<br>Χαρακτήρας | Θέσεις και Κατάλοιπα των Αμινοξέων |     |     |     |     |     |     |
|-------------------|------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                   | 156                                | 214 | 216 | 223 | 277 | 291 | 352 |
| $A^1$ ή B         | Pro                                | Met | Phe | Glu | Val | Asp | Arg |
| $A^1$             | Leu                                | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| $A^2$             | -                                  | -   | -   | -   | -   | -   | Gly |
| $A^2$ ή $B^{3*}$  | -                                  | -   | -   | -   | -   | -   | Trp |
| $A_2$             | -                                  | -   | -   | -   | Met | -   | -   |
| $A^{3*}$ ή $B^x$  | -                                  | -   | -   | -   | -   | Asn | -   |
| $B^{el}$          | -                                  | -   | -   | Asp | -   | -   | -   |
| $A^x$             | -                                  | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| $A^{el}$          | Leu                                | -   | Ile | -   | -   | -   | -   |
| $B^{el}$          | -                                  | Arg | Ile | -   | -   | -   | -   |

Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι βρήκαν μία προσθήκη νουκλεοτιδίου (G) στη περιοχή 798-804 που περιέχει επαναλήψεις γουανίνης, σε ένα από τα αλληλόμορφα που λαμβάνονται από τα δείγματα με  $A_{el}$  φαινότυπο,  $ABO^*A109$ . Αυτή η αλλαγή έχει ως αποτέλεσμα αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης που οδηγεί σε μια διαφορετική αμινοξική αλληλουχία και τη δημιουργία ενός κωδικονίου λήξης σε διαφορετική θέση. Αυτή η αλλαγή οδηγεί σε μεγαλύτερη μείωση του επιπέδου της ενζυματικής δραστηριότητας από εκείνη του  $ABO^*A105$  ( $A_2$ ) αλληλομόρφου που έχει μια νουκλεοτιδική έλλειψη μεταξύ των θέσεων 1059 και 1061. Σύμφωνα με την αλληλουχία του γενωμικού κλώνου που περιγράφεται από τον Yamamoto et al.1995, το νέο κωδικόνιο λήξης (TGA) έχει τεκμηριωθεί ότι είναι στη νουκλεοτιδική θέση 1170-1172[25]. Πολύ πρόσφατα οι Olsson et al.1995 εντόπισαν το ίδιο αλληλόμορφο σε δείγματα με  $A_{el}$  φαινότυπο[84].

Σχετικά με τα αλληλόμορφα που λαμβάνονται από τα  $A^2$  άτομα, είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί η διαφορά στις συχνότητες των αλληλομόρφων που περιγράφονται από αυτούς και από άλλους[46]. Οι Yamamoto et al.1992 ανέφεραν ότι όλα τα 8 αλληλόμορφα από τα δείγματα αίματος με  $A^2$  φαινότυπο, που λήφθηκαν από το Αμερικάνικο Ερυθρό Σταυρό (Portland, OR) είχαν μια νουκλεοτιδική έλλειψη μεταξύ των θέσεων 1059 και 1061, η οποία ήταν πανομοιότυπη με αυτή του  $ABO^*A105$  στην παρούσα εργασία. Σε αντίθεση, βρήκαν τρία άλλα αλληλόμορφα από 19 Ιαπωνέζους που είχαν  $A^2$  φαινότυπο. Ανάμεσά τους,  $ABO^*A106$  και  $^*A107$  κυριαρχούσαν σε σχετικές συχνότητες των 53% και 37%, αντίστοιχα. Αυτά τα αποτελέσματα ξεκάθαρα υποδεικνύουν ότι πολλαπλά αλληλόμορφα θα μπορούσαν να προκαλέσουν ένα συγκεκριμένο ABO φαινότυπο και ότι οι συχνότητές τους ποικίλουν μεταξύ διαφόρων πληθυσμών[40].

Οι Yamamoto et al.1990 ήταν οι πρώτοι που ανέφεραν ότι υπάρχουν επτά νουκλεοτιδικές διαφορές μεταξύ των A και B αλληλομόρφων, στις νουκλεοτιδικές θέσεις 297, 526, 657, 703, 796, 803, και 930 και έχουν ως αποτέλεσμα τέσσερις διαφορές στην αλληλουχία των αμινοξέων, στις θέσεις 176, 235, 266, και 268. Έδειξαν ότι τα τελευταία δύο αμινοξικά κατάλοιπα στις θέσεις 266 και 268 είναι σημαντικά για την A/B μεταφορά με ειδικότητα σακχάρου στην ανοικοδόμηση του γονιδίου και σε μελέτες έκφρασής του[32]. Ένα αλληλόμορφο που κωδικοποιεί μια διλειτουργική μεταφορά με ειδικότητα σακχάρου εν συνεχεία εντοπίστηκε σε cis-AB άτομα[53]. Αυτό το αλληλόμορφο κωδικοποιεί μια μεταφορά με μια αμινοξική αλληλουχία ταυτόσημη με αυτή της  $A_1$  μεταφοράς εκτός από μία

αντικατάσταση στη θέση 268 η οποία υπάρχει και στη B τρανσφεράση. Ως αποτέλεσμα αυτής της αμινοξικής αντικατάστασης τα ερυθροκύτταρα των cis-AB ατόμων μπορούν να εκφράσουν και τα δύο A και B παράγωγα. Στην παρούσα μελέτη, επίσης προσδιόρισαν ένα αλληλόμορφο, που προσωρινά ονομάστηκε ABO\*C101, σε δύο μη συσχετιζόμενες cis-AB οικογένειες μέσω PCR-SSCP ανάλυσης, και η νουκλεοτιδική του αλληλουχία ήταν ταυτόσημη με αυτή του αλληλομόρφου, που περιγράφηκε προηγουμένως, υπεύθυνο για τον cis-AB φαινότυπο[53].

Από την άλλη πλευρά, σε ένα A<sup>2</sup> άτομο ανιχνεύσαμε ένα νέο αλληλόμορφο (ABO\*R101) που έχει 6 νουκλεοτιδικές διαφορές με αποτέλεσμα τρεις διαφορές στην αμινοξική αλληλουχία, στις θέσεις 176, 235, και 277, σε σύγκριση με τη κοινή A<sup>1</sup> τρανσφεράση που κωδικοποιείτε από το αλληλόμορφο ABO\*A101. Αν και η κωδικοποιούμενη τρανσφεράση από το ABO\*R101 αλληλόμορφο έχει ίδια αμινοξικά κατάλοιπα στις θέσεις 176 και 235 με αυτά της B τρανσφεράσης, εκείνα στις θέσεις 266 και 268 είναι ίδια με αυτά της A<sup>1</sup> τρανσφεράσης. Έτσι τα αμινοξικά κατάλοιπα στις θέσεις 176 και 235 δεν επηρεάζουν την ειδικότητα της A/B τρανσφεράσης, ενώ αυτά στις θέσεις 266 και 268 συμπεραίνεται ότι είναι κρίσιμα[40].

## **2.4 Εξελικτική σχέση των ABO αλληλομόρφων**

Σε μία προηγούμενη μελέτη[86], ταξινομήσαμε τα αλληλόμορφα που είναι υπεύθυνα για τους κοινούς ABO φαινότυπους σε τρεις βασικές εξελικτικές γραμμές \*A/\*O1, \*B, και \*O2, από την άποψη των εξελικτικών σχέσεων τους. Έξι από τα 11 διαφορετικά αλληλόμορφα από τους ποικίλους φαινότυπους που καθορίζονται σε αυτή τη μελέτη, ABO\*A105, \*A106, \*A107, \*C101, \*A108, και \*A109, έχουν μόνο μία διαφορά νουκλεοτιδίου σε σχέση με τα ABO\*A101 ή \*A102. Έτσι αυτά τα έξι ποικίλα αλληλόμορφα μπορεί να ανήκουν στην ABO\*A εξελικτική γραμμή. Παρομοίως, τρία B αλληλόμορφα (ABO\*B104, \*B105, και \*B106) έχουν μία διαφορά νουκλεοτιδίου σε σύγκριση με το ABO\*B101 αλληλόμορφο, και έτσι μπορεί να ανήκουν στην ABO\*B εξελικτική γραμμή.

Κατασκεύασαν φυλογενετικά δέντρα για να οριοθετήσουν τις σχέσεις μεταξύ των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που καθορίζονται σε αυτή τη μελέτη, όπως έγινε και σε προηγούμενη μελέτη[86]. Ένα φυλογενετικό δέντρο μπορεί να περιέχει πολλά

ίσα παρακλάδια[87], και μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι μια γενίκευση της δυσαρμονίας του διαγράμματος που προτείνει ο Fitch[88]. Είναι ξεκάθαρο ότι υπάρχουν δύο διακριτές εξελικτικές γραμμές οι \*A και \*B.

Σε αντίθεση, το αλληλόμορφο ABO\*R101 έχει έξι διαφορετικά νουκλεοτίδια στις θέσεις 297, 526, 657, 703, 771, και 829, σε σύγκριση με το ABO\*A101. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του ABO\*R101 είναι ίδια με αυτή του ABO\*B101 εκτός της νουκλεοτιδικής θέσης 703 και με αυτή του \*O2O1 εκτός της νουκλεοτιδικής θέσης 771. Με βάση αυτά τα ευρήματα, το ABO\*R101 αλληλόμορφο μπορεί να έχει προκύψει από ανασυνδυασμό μεταξύ των ABO\*B101 και του \*O2O1 γύρω από την περιοχή 703-771 και μπορεί να ανήκει σε μία ενδιάμεση εξελικτική γραμμή μεταξύ του ABO\*B και \*O2 (εικόνα 36A). Παρόμοια το αλληλόμορφο ABO\*A110 έχει μια νουκλεοτιδική αλληλουχία ίδια με αυτή του ABO\*A102, εκτός από τα νουκλεοτίδια στις θέσεις 646 και 681 που είναι τα ίδια με του \*O2O1. Έτσι, το ABO\*A110 είναι πιθανό να προέρχεται τόσο από ένα διπλό ανασυνδυασμό ή από ένα γεγονός μετατροπής του γονιδίου (εικόνα 36B) και από συσσώρευση νουκλεοτιδικών αντικαταστάσεων[40].

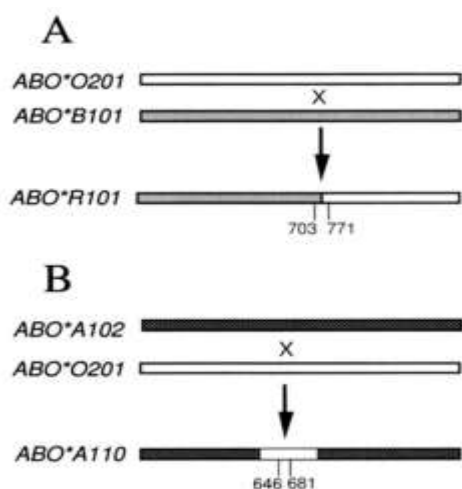


Fig 4. Schemes for generation of (A) ABO\*R101 and (B) ABO\*A110 alleles.

**Εικόνα 36:** Σχήματα που υποδεικνύουν την προέλευση των (A) ABO\*R101 και (B) ABO\*A110 αλληλομόρφων.

Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν διαφορετικά αλληλόμορφα είναι υπεύθυνα για τους ίδιους ABO ποικίλους φαινότυπους, και ότι η εξελικτική τους γραμμή δεν είναι απαραίτητα η ίδια[40].

## **2.5 Εξωτερική αξιολόγηση ποιότητας (EQA) στη μοριακή ανοσοαιματολογία: INSTAND το πρόγραμμα δοκιμών ικανότητας**

Η γονοτύπηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC), των αιμοπεταλίων και των αντιγόνων των κοκκιοκυττάρων είναι ένα νέο εργαλείο για την κλινική παθολογία, τις υπηρεσίες της ιατρικής των μετάγγισεων και των τραπεζών αίματος. Η άριστη γνώση των εργαστηριακών εξετάσεων μπορεί να προσδιοριστεί από εξωτερικές αξιολογήσεις της ποιότητας (EQAS), οι οποίες απαιτούνται για την κλινική εφαρμογή σε πολλά συστήματα υγειονομικής περίθαλψης. Υπάρχουν λίγα EQAS για τη μοριακή ανοσοαιματολογία [89].

Ξεκινήσανε από την ανάλυση της συμμετοχής και των ποσοστών επιτυχίας ενός EQA για τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα αιμοπεταλία και τα αντιγόνα των κοκκιοκυττάρων. Αυτό το EQA διανεμήθηκε από την INSTAND, ένα μεγάλο πάροχο μη κερδοσκοπικού χαρακτήρα δοκιμασιών επάρκειας, δύο φορές το χρόνο από το φθινόπωρο του 2006 ως το EQA νούμερο. 235 Ανοσοαιματολογία Α (μοριακή διαγνωστική). Οι συντονιστές ορίζουν από την αρχή ποιά αλληλόμορφα είναι υποχρεωτικά για την ανίχνευση.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο αριθμός των συμμετεχόντων αυξάνεται σταθερά από 51 έως 73 ανά επάρκεια από το φθινόπωρο του 2012. Περισσότερα από 60 ιδρύματα χρησιμοποιούν αυτό το EQA τουλάχιστον μία φορά το χρόνο. Περίπου το 80% αυτών συμμετείχαν σε RBC, το 68% σε αιμοπετάλια και 22% σε συστήματα κοκκιοκυττάρων. Με τις εξαιρέσεις του RHD (82%) και των κοκκιοκυττάρων (85%), τα ποσοστά επιτυχίας ξεπέρασαν το 93%. Ενώ το ποσοστό επιτυχίας αυξήθηκε για τα κοκκιοκύτταρα και μειώθηκε για το σύστημα ABO, τα ποσοστά επιτυχίας για τα άλλα συστήματα άλλαξαν ελάχιστα στο διάστημα των 6 ½ ετών.

Εν κατακλείδι, το πρόγραμμα δοκιμασίας επάρκειας INSTAND είχε χρησιμοποιηθεί τακτικά για το EQA από πολλά ιδρύματα, κυρίως στην Κεντρική Ευρώπη. Ενώ οι τεχνικές προδιαγραφές και τα ποσοστά επιτυχίας στα συμμετέχοντα εργαστήρια ήταν υψηλά, υπήρξε μικρή βελτίωση στα ποσοστά επιτυχίας από το 2006 και μετά [89].

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Ορολογικές μέθοδοι προσδιορισμού της ABO ομάδας αίματος**

Τα αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα είναι πρωτεΐνες της κατηγορίας των γ-σφαιρινών που καλούνται και ανοσοσφαιρίνες (Immunoglobulins), με συμβολισμό Ig. Οι ανοσοσφαιρίνες είναι πολλών ειδών, IgM, IgG, IgA, IgE κλπ.

Τα αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα αποτελούν ένα μικρό υποσύνολο των ανοσοσφαιρινών και ανήκουν κυρίως στις κατηγορίες IgM (μοριακού βάρους περίπου 900000-1000000) και IgG (μοριακού βάρους περίπου 300000). Επειδή τα αντισώματα αυτά, όταν συνευρεθούν με τα αντίστοιχα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα (συγκολλητινογόνα) που βρίσκονται τοποθετημένα στην κυτταρική μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων, αντιδρούν και προκαλούν συγκόλληση των ερυθρών, συχνά τα αποκαλούμε συγκολλητίνες [16].

Κάθε άτομο κληρονομεί από τους φυσικούς γονείς του τα ερυθροκυτταρικά του αντιγόνα, τα οποία του καθορίζουν την ομάδα αίματος. Στο άμεσο παρελθόν ήταν αποδεκτό, ότι τα αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα κατατάσσονταν σε φυσικά και άνοσα.

Όταν για οποιονδήποτε λόγο στην κυκλοφορία ενός ατόμου εισέλθουν ερυθρά αιμοσφαίρια άλλου ατόμου διαφορετικής ομάδας αίματος, τότε θα αναγνωριστούν τα ξένα αντιγόνα και θα κατασκευαστούν ταχέως αντισώματα που θα ενωθούν μαζί τους και θα προκαλέσουν καταστροφή των “εισβολέων” ερυθρών. Τα αντισώματα που αναπτύχθηκαν λέγονται άνοσα και ανήκουν κυρίως στην κατηγορία των IgG. Απαραίτητα προϋπόθεση για τη δημιουργία τους είναι η είσοδος ερυθρών αιμοσφαιρίων με άγνωστα στον οργανισμό αντιγόνα, ώστε να προκύψει ανοσοποίηση[16].

Στον ορό πολλών ανθρώπων όμως, ανιχνεύονται αντισώματα (π.χ αντι-A ή αντι-B) τα οποία μολονότι δεν προήλθαν από ανοσοποίηση, δηλαδή από είσοδο ξένων αντιγόνων στον οργανισμό, μπορούν να αναγνωρίζουν ερυθροκυτταρικά αντιγόνα και να αντιδρούν μαζί τους. Τα αντισώματα αυτά ονομάζονται φυσικά και είναι κυρίως ανοσοσφαιρίνες IgM, λιγότερα IgG και σπανίως IgA.

Η ονομασία “φυσικά” αντισώματα δεν είναι ακριβής και δεν ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα. Για παράδειγμα, αντισώματα αντι-A και αντι-B δεν υπάρχουν στον ορό των νεογνών. Εμφανίζονται τους πρώτους μήνες της βρεφικής περιόδου και αυξάνονται σταδιακά μέχρι την ηλικία των 4-5 ετών. Έκτοτε παραμένουν σταθερά

για την υπόλοιπη ζωή του ανθρώπου. Συχνά στα ηλικιωμένα άτομα, τα επίπεδα των αντι-Α και αντι-Β αντισωμάτων είναι χαμηλότερα σε σύγκριση με τους νέους ενήλικες.

Όλα τα προαναφερόμενα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι και τα αποκαλούμενα “φυσικά” αντισώματα είναι το αποτέλεσμα μιας άνοσης αντίδρασης (αντιγόνου-αντισώματος), δηλαδή κάποιο άγνωστο αντιγόνο εισήλθε στον οργανισμό και αυτός με τη σειρά του απάντησε δημιουργώντας ένα αντίσωμα που να ταιριάζει στο συγκεκριμένο αντιγόνο.

Επομένως, στην πραγματικότητα και τα φυσικά είναι άνοσο αντισώματα, πολλές φορές όμως συνεχίζουμε να διατηρούμε αυτή τη διάκριση για ευκολότερη συνεννόηση [16].

Όταν δεν υπάρχει γνωστό αίτιο ανοσοποίησης, η δημιουργία φυσικών αντισωμάτων μπορεί να εξηγηθεί με δύο υποθέσεις που ακολουθούν πολύπλοκους μηχανισμούς.

Αυτές είναι:

- 1) Η θεωρία του Burnet και
- 2) Η θεωρία του Wiener.

Σε γενικές γραμμές μπορούμε να διατυπώσουμε τα εξής:

Στη φύση υπάρχουν ουσίες ευρύτατα διαδεδομένες ( μέσα σε τροφές, βακτηρίδια κ.λ.π) που έχουν δομή εντελώς όμοια ή σχεδόν όμοια με τη δομή των ερυθροκυτταρικών αντιγόνων. Αμέσως μόλις γεννηθεί το παιδί, επειδή ο πεπτικός σωλήνας του παρουσιάζει κάποια αωρότητα τους πρώτους μήνες της εξωμήτριας ζωής, εισέρχονται στον οργανισμό του αυτά τα αντιγόνα, είτε με μικρόβια είτε με τροφές και δεσμεύονται από τα φαγοκύτταρα και φαγοκυτταρώνονται.

- Αν ο οργανισμός διαθέτει στα κύτταρά του κάποιο από αυτά τα αντιγόνα, τα αναγνωρίζει και δεν κινεί τη διαδικασία της άνοσης αντίδρασης για την παραγωγή αντισωμάτων.
- Αντίθετα, αν κάποιο αντιγόνο δε συμπεριλαμβάνεται στα δικά του, τότε μόλις πραγματοποιηθεί η φαγοκυττάρωση στα μακροφάγα φαγοκύτταρα, δίνεται εντολή να ξεκινήσει η διαδικασία της άνοσης αντίδρασης για να παραχθούν αντισώματα εναντίον αυτού του αντιγόνου,

Αυτά θα λέγονται φυσικά (δια ευκολία), ανήκουν στην κατηγορία των IgM ανοσοσφαιρινών και είναι ψυχρού τύπου. Τα επίπεδά τους διαφέρουν από άτομο σε άτομο.

Αν στο μέλλον, εισχωρήσει παρεντερικά (π.χ με εμβόλια, με μετάγγιση αίματος κ.λ.π) κάποιο αντιγόνο από αυτά στον οργανισμό, αναγνωρίζεται ταχύτατα και επαναπραγματοποιείται αναμνηστική άνοση αντίδραση με παραγωγή νέων αντισωμάτων που θα λέγονται άνοσα, ανήκουν στις κατηγορίες των IgM και IgG ανοσοσφαιρινών κυρίως και είναι θερμού τύπου. Τα επίπεδά τους θα έχουν υψηλούς τίτλους.

Η παραγωγή αντισωμάτων αρχίζει κανονικά μετά τη γέννηση. Για αυτό, ο έλεγχος ενός βρέφους έως 6 μηνών δεν είναι αξιόπιστος γιατί περιέχει αντισώματα της μητέρας του που πέρασαν σε αυτό μέσω του πλακούντα.

Σαν φυσικές συγκολλητίνες θεωρούνται οι ανοσφαιρίνες αντι-A και αντι-B και αντι-H. Η παρουσία τους θεωρείται πολύ χρήσιμη γιατί μας πιστοποιούν απόλυτα τις ομάδες αίματος ως προς το σύστημα ABO [16].

❖ Ουσίες που αναγνωρίζουν τα αντιγόνα ABO φυτικής ή ζωικής προέλευσης.

Σήμερα υπάρχουν αρκετά φυτικά ή ζωικά παρασκευάσματα που δρούν σαν συγκολλητίνες. Η χρήση τους στα εργαστήρια και κυρίως στις αιμοδοσίες είναι ευρύτατα διαδεδομένη. Η μεγάλη βοήθεια που μας προσφέρουν είναι η ταυτοποίηση της ομάδας αίματος άγνωστων ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Μερικά απο τα παρασκευάσματα αυτά που λέγονται και λεκτίνες είναι:

- 1) Η ουσία αντι-A, λαμβανόμενη απο αδένες ή αυγά φιδιών που ανήκουν στα είδη *Helix pomatia*, *Helix hortensis* κ.α.
- 2) Η ουσία αντι-B, αντλούμενη από το μύκητα *Fomes fomentarius*.
- 3) Η ουσία αντι-A<sup>1</sup>, που παρασκευάζεται απο σπόρους του φασολιού *Dolichos biflorus*. Έχει την πολύτιμη ιδιότητα να αντιδρά πολύ έντονα με ερυθρά υποομάδας A<sup>1</sup>, προκαλώντας συγκολλήσεις ενώ αντιδρά ελάχιστα ή καθόλου με ερυθρά υποομάδας A<sup>2</sup>. Με τον τρόπο αυτό μπορούμε να διακρίνουμε τις υποομάδες της ομάδας A.

- 4) Η ουσία αντι-H, η οποία λαμβάνεται από εκχυλίσματα του φασολιού *Ulex Europaeus*. Αυτή αντιδρά και προκαλεί συγκολλήσεις με ερυθρά ομάδας O, A<sup>2</sup> και A<sup>2</sup>B αλλά παρουσιάζει πολύ μικρή αντίδραση με ελάχιστη ή ανύπαρκτη συγκόλληση σε ερυθρά ομάδας A<sup>1</sup>, A<sup>1</sup>B και B [16].

### **3.1 Προσδιορισμός της ομάδας αίματος στην πλάκα**

#### **A) Προσδιορισμός των ερυθροκυτταρικών αντιγόνων A και B στην πλάκα**

Με την μέθοδο αυτή ανιχνεύεται η παρουσία ή απουσία των αντιγόνων A και B στα εξεταζόμενα ερυθροκύτταρα [90].

#### **Υλικά και Μέθοδος**

- Πλάκα βακελίτη ή πλάκα με εσοχές μιας χρήσεως
- Γνωστοί αντιοροί (αντι-A, αντι-B, αντι-AB)
- Δείγμα ολικού αίματος ή εναιωρήματος ερυθρών (20% - 25% σε NaCl 0,9%)
- Σιφόνια Pasteur
- Στειλεοί για ανάμειξη

Αρχικά σε ειδική πλάκα βακελίτη, σημειώνονται τρεις οριζόντιες θέσεις (1-3), γνωστών αντιορών (αντισωμάτων) αντι-A, αντι-B, αντι-AB. Με σιφόνιο Pasteur τοποθετείται σε κάθε σημειωμένη θέση μια σταγόνα από τους αντίστοιχους αντιορούς. Σε κάθε θέση προστίθεται μία σταγόνα ολικού αίματος ή εναιωρήματος των υπό εξέταση ερυθροκυττάρων.

- 1<sup>η</sup> θέση: Μία σταγόνα αντι-A και μία σταγόνα ερυθρά.
- 2<sup>η</sup> θέση: Μία σταγόνα αντι-B και μία σταγόνα ερυθρά.
- 3<sup>η</sup> θέση: Μία σταγόνα αντι-AB και μία σταγόνα ερυθρά.

Αμέσως μετά γίνεται κυκλική ανάμειξη με την βοήθεια στειλεών και μακροσκοπική παρατήρηση για τυχόν συγκολλήσεις (Εικ. 37). Ο χρόνος που απαιτείται για την εμφάνιση συγκόλλησης είναι περίπου 2 λεπτά.



**Εικόνα 37:** Προσδιορισμός της ομάδας αίματος του ασθενούς με βάση το εναιώρημα ερυθρών του. Χρησιμοποιήσαμε 1 σταγόνα από τους αντιορούς αντι-B, αντι-A και αντι-AB αντίστοιχα. Αποτέλεσμα η μη συγκόλληση των ερυθρών. Ομάδα αίματος του ασθενούς O. (Θα επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα αυτό κάνοντας και τον ανάστροφο προσδιορισμό της ομάδας αίματος παρακάτω).

### Συμπέρασμα

Σε περίπτωση που τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα συνενωθούν με τα αντίστοιχα αντισώματα, παρατηρείται συγκόλληση με την μορφή κροκίδων και το αποτέλεσμα θεωρείται θετικό. Η μη ύπαρξη συγκόλλησης, λαμβάνεται ως αρνητικό αποτέλεσμα και δηλώνει την απουσία του αντίστοιχου αντιγόνου από τα ερυθροκύτταρα. Η διαδικασία θεωρείται ολοκληρωμένη, επιβεβαιώνοντας την ομάδα με τον προσδιορισμό των αντισωμάτων.

### Β) Προσδιορισμός των αντισωμάτων αντι-A και αντι-B στην πλάκα.

Με την μέθοδο αυτή ανιχνεύεται η ύπαρξη των αντισωμάτων αντι-A και αντι-B στον ορό [90].

### Υλικά και Μέθοδος

- Πλάκα βακελίτη ή πλάκα με εσοχές μιας χρήσεως
- Εναιώρημα γνωστών ερυθροκυττάρων (20% - 25% σε NaCl 0,9%) ομάδων A, B, O
- Υπό εξέταση ορός
- Σιφόνια Pasteur
- Στείλεοί για ανάμειξη

Σε συνέχεια του ελέγχου, στην ίδια πλάκα σημειώνονται τρεις ακόμη οριζόντιες θέσεις (4-6), εναιωρήματος γνωστών ερυθροκυττάρων ομάδας A, B και O που προέρχονται από τρία έως πέντε άτομα. Με σιφόνιο Pasteur τοποθετείται σε κάθε θέση μια σταγόνα του υπό εξέταση ορού. Σε κάθε θέση προστίθεται μία σταγόνα εναιωρήματος πλυμένων ερυθρών ομάδων A, B, O.

- 4<sup>η</sup> θέση: Μία σταγόνα ορού και μία σταγόνα εναιωρήματος ερυθρών ομάδας A
- 5<sup>η</sup> θέση: Μία σταγόνα ορού και μία σταγόνα εναιωρήματος ερυθρών ομάδας B
- 6<sup>η</sup> θέση: Μία σταγόνα ορού και μία σταγόνα εναιωρήματος ερυθρών ομάδας O

Ακολουθεί κυκλική ανάμειξη και μακροσκοπική ανάγνωση για τυχόν συγκολλήσεις (Εικ.38).



**Εικόνα 38:** Ανάστροφη διαδικασία προσδιορισμού της ομάδας αίματος του ασθενούς. Τα πρότυπα ερυθρά Α και Β που χρησιμοποιήσαμε αντιδρούν με τον ορό του ασθενούς προκαλώντας συγκολλήσεις. Ομάδα αίματος ασθενούς Ο.

### Συμπέρασμα

Η τυχόν συγκόλληση δηλώνει την ύπαρξη του αντίστοιχου αντισώματος στον ορό και το αποτέλεσμα θεωρείται θετικό, σε διαφορετική περίπτωση δεν υπάρχει συγκόλληση και το αποτέλεσμα θεωρείται αρνητικό.

### Γ) Προσδιορισμός υποομάδων αίματος του συστήματος ABO στην πλάκα.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, η συγκόλληση μπορεί να είναι ασθενής όταν το υπό εξέταση δείγμα ανήκει στην ομάδα A, τότε ο προσδιορισμός θα γίνει με γνωστό αντιγόνο A<sub>1</sub> και ολικό αίμα ή εναιώρημα των υπό εξέταση ερυθρών (2%-5% σε ισότονο διάλυμα NaCl 0,9%) [90].

#### Υλικά και Μέθοδος

- Αντικειμενοφόρος πλάκα.
- Λεκτίνη (αντι-A<sub>1</sub>)
- Δείγμα ερυθρών ή εναιωρήματος ερυθρών
- Σιφόνιο Pasteur
- Στείλεοι για ανάμειξη

Σε αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετείται μια σταγόνα λεκτίνης αντι-A<sub>1</sub> και προστίθεται μια σταγόνα των υπό εξέταση ερυθροκυττάρων. Κυκλική ανάμειξη με τη βοήθεια στείλεου και ανάγνωση του αποτελέσματος. Η θετικότητα της αντίδρασης στηρίζεται στη συγκόλληση μεταξύ αντιγόνου και αντισώματος. Η λεκτίνη συγκολλά τα ερυθροκύτταρα υποομάδας A<sub>1</sub>, όχι όμως τα ερυθροκύτταρα της υποομάδας A<sub>2</sub>.



**Εικόνα:** Στην πρώτη σειρά A<sub>2</sub> θετική η ομάδα του ασθενούς, στη τελευταία σταγόνα δεν παρατηρείται συγκόλληση των ερυθρών με την A<sub>1</sub> αντι-λεκτίνη. Στην δεύτερη σειρά A θετική η ομάδα του ασθενούς.

Σημείωση: βρέφη μικρότερα των 6 μηνών που τα ερυθροκυτταρικά τους αντιγόνα αφενός δεν είναι ισχυρά και αφετέρου τα αντισώματα στο πλάσμα τους αναπτύσσονται σταδιακά κτρίως μετά τον 3<sup>ο</sup> -6<sup>ο</sup> μήνα, πιθανός να εμφανίζουν προβλήματα στον καθορισμό της ομάδας τους ως προς το σύστημα ABO.

### **3.2 Προσδιορισμός της ομάδας αίματος σε σωληνάρια (*in vitro*)**

Οι διαδικασίες που τελούνται υπό φυσιολογικές συνθήκες εντός οποιουδήποτε έμβριου οργανισμού λέμε ότι συμβαίνουν *in vivo*.

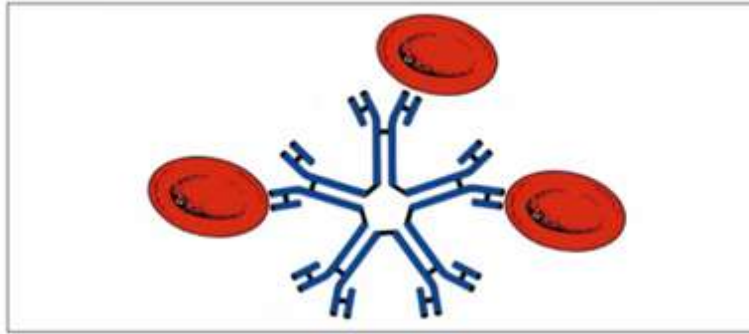
Πολλές απο αυτές, έχουμε τη δυνατότητα μιμούμενοι τις συνθήκες κάτω απο τις οποίες συμβαίνουν να τις πραγματοποιήσουμε στο εργαστήριο (σε σωληνάρια). Τότε λέμε ότι εκτελέστηκαν *in vitro*.

Η μεθοδολογία αυτή είναι πάρα πολύ χρήσιμη γιατί μας βοηθά να κατανοήσουμε κάποια άγνωστα προβλήματα καθώς και να προλάβουμε ατυχή συμβάματα που θα παρατηρούνταν σε ασθενείς. Για παράδειγμα, όταν θέλουμε να μεταγγίσουμε έναν ασθενή με αίμα, έχουμε την ευκαιρία να δούμε αν τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα του δότη αντιδρούν με τα αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα του δέκτη, ώστε να διαπιστώσουμε αν η μετάγγιση είναι συμβατή ή ασύμβατη και να προλάβουμε τα ατυχή γεγονότα που ακολουθούν μια ασύμβατη μετάγγιση [16].

Η δομή και οι ιδιότητες των δύο βασικότερων κατηγοριών αντισωμάτων IgM και IgG διαφέρουν, για αυτό και χρησιμοποιούνται διαφορετικοί τρόποι ανίχνευσής τους.

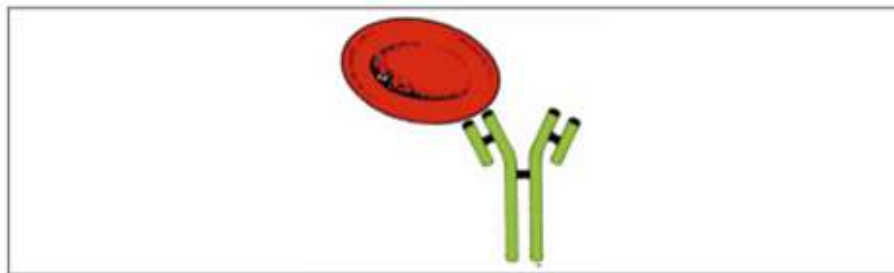
Οι IgM ανοσοσφαιρίνες είναι μεγαλύτερες σε μέγεθος και όγκο (Εικ. 39), υπάρχουν με τη μορφή πενταμερούς μορίου μέσα στον ορό και διαθέτουν 10 θέσεις καθεμιά με τις οποίες μπορούν να ενωθούν με τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα. Το μεγάλο μέγεθος τις βοηθά να συλλαβάνουν δύο ή περισσότερα γειτονικά ερυθρά και να τα συγκολλούν.

Τα IgM αντισώματα εκτός από μεγάλο μέγεθος έχουν και μεγάλο εύρος θερμικής δράσης. Μπορούν να δρουν σε θερμοκρασία 4<sup>ο</sup>C (ψυγείου) ονομαζόμενα και ψυχροσυγκολλητίνες, σε θερμοκρασία 10<sup>ο</sup>C (δωματίου) και σε θερμοκρασία 37<sup>ο</sup>C (σώματος) [16].



**Εικόνα 39:** Το αντίσωμα IgM έχει τη δυνατότητα να συλλαμβάνει και να συγκολλά δύο ή περισσότερα ερυθρά αιμοσφαίρια.

Αντίθετα οι IgG ανοσοσφαιρίνες έχουν μικρότερο μέγεθος και κυκλοφορούν στον ορό σαν μόρια μονομερή (Εικ. 40). Αυτό σημαίνει πως ευαισθητοποιούν τα ερυθρά αιμοσφαίρια προσκολλώντας επάνω τους αλλά αδυνατούν εξαιτίας του μικρού τους μεγέθους να προκαλέσουν τη συγκόλλησή τους.



**Εικόνα 40:** Το IgG αντίσωμα έχει την ικανότητα να συνδεθεί με ερυθρά αιμοσφαίρια αλλά δε δύναται πάντα να τα συγκολλάει.

Σύμφωνα με αυτές τις ιδιότητες διακρίνουμε τα αντισώματα σε δύο κατηγορίες:

- 1) Εκείνα που είναι ικανά να προκαλέσουν συγκόλληση σε ισότονο διάλυμα χλωριούχου νατρίου και τα ονομάζουμε πλήρη ή διδύναμα.
- 2) Εκείνα που αδυνατούν να προκαλέσουν συγκόλληση σε ισότονο διάλυμα χλωριούχου νατρίου αλλά μόνο προσηλώνονται στην επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων χωρίς να φαίνεται η παρουσία τους και ονομάζονται ατελή ή μονοδύναμα.

Στα πλήρη ανήκουν IgM κυρίως αντισώματα και στα ατελή IgG. Η ανίχνευση αντισωμάτων IgM του συστήματος ABO με τη χρήση γνωστών αντιορών σε εναιώρημα ερυθροκυττάρων εντός ισότονου διαλύματος χλωριούχου νατρίου γίνεται

εύκολα. Κι αυτό γιατί η απόσταση μεταξύ των ερυθρών είναι τέτοια, ώστε το μεγάλο μόριο της IgM ανοσοσφαιρίνης μπορεί να την καλύψει και να συγκολλήσει γειτονικά ερυθρά. Η εξέταση πρέπει να γίνεται στους 4, 20 και 37°C [16].

#### A)Προσδιορισμός των ερυθροκυτταρικών αντιγόνων A και B σε σωληνάρια.

##### Υλικά και Μέθοδος

- Δοκιμαστικά σωληνάρια
- Στατό
- Γνωστοί αντιοροί (αντι-A, αντι-B, αντι-AB)
- Εναιώρημα ερυθροκυττάρων (2% - 5% σε NaCl 0,9%)
- Σιφόνια Pasteur

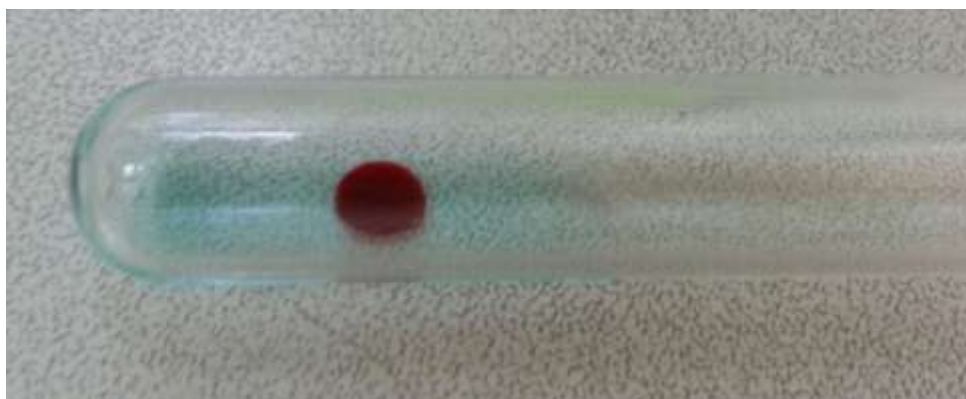
Ο προσδιορισμός των ομάδων αίματος σε σωληνάρια αιμολύσεως γίνεται ως εξής:

Σειρά τριών σωληναρίων τοποθετούνται σε στατό. Με σιφόνιο Pasteur τοποθετείται αντίστοιχα σε κάθε θέση από μια σταγόνα αντιορών (αντι-A, αντι-B, αντι-AB)

Σε κάθε σωληνάριο προστίθεται μια σταγόνα εναιωρήματος των υπο εξέταση ερυθροκυττάρων [90].

- Στο 1<sup>ο</sup> σωληνάριο τοποθετείται μία σταγόνα αντιορού του εμπορίου αντι-A και μια σταγόνα εναιωρήματος ερυθρών.
- Στο 2<sup>ο</sup> σωληνάριο τοποθετείται μία σταγόνα αντιορού του εμπορίου αντι-B και μια σταγόνα εναιωρήματος ερυθρών.
- Στο 3<sup>ο</sup> σωληνάριο τοποθετείται μία σταγόνα αντιορού του εμπορίου αντι-AB και μια σταγόνα εναιωρήματος ερυθρών.

Ήπια ανακίνηση των σωληναρίων και φυγοκέντρωση για 15"-30" σε 1000 στροφές/λεπτό. Ανακίνηση εκ νέου των σωληναρίων και μακροσκοπική ανάγνωση για πιθανή συγκόλληση (Εικ. 41).



**Εικόνα 41:** Συγκόλληση των ερυθροκυττάρων με χρήση του αντιορού αντι-A, θετικό αποτέλεσμα. Ύπαρξη αντιγόνου A στην επιφάνεια των ερυθρών του ασθενούς. Ασθενής ομάδας αίματος A.

### Συμπεράσματα

Η τυχόν συγκόλληση των ερυθροκυττάρων με κάθε τύπο αντιορού δηλώνει την ύπαρξη του αντίστοιχου αντιγόνου και το αποτέλεσμα θεωρείται θετικό. Η μη ύπαρξη συγκόλλησης δίνει αρνητικό αποτέλεσμα. Η επιβεβαίωση της ομάδας επιτυγχάνεται και με τον προσδιορισμό των αντισωμάτων στον ορό.

Σημείωση: το δείγμα αίματος θα πρέπει να είναι πρόσφατο και όχι αιμολυμένο.

### Β)Προσδιορισμός των αντισωμάτων αντι-A και αντι-B, σε σωληνάρια.

#### Υλικά και Μέθοδος

- Δοκιμαστικά σωληνάρια
- Στατό
- Εναιώρημα ερυθρών (20% - 25% σε NaCl 0,9%) γνωστών ομάδων αίματος A, B και O.
- Υπό εξέταση ορός
- Σιφόνια Pasteur

Σε συνέχεια του ελέγχου, τοποθετούνται άλλα τρία σωληνάρια στο στατό, με αρίθμηση από το 4-6. Σε κάθε σωληνάριο, τοποθετείται από μια σταγόνα του υπό εξέταση ορού και προστίθεται μια σταγόνα (σε κάθε θέση) εναιωρήματος ερυθρών, ομάδων A,B, και O [90].

- Στο 4<sup>ο</sup> σωληνάριο τοποθετείται μία σταγόνα ορού και προστίθεται εναιώρημα γνωστών ερυθρών ομάδας Α.
- Στο 5<sup>ο</sup> σωληνάριο τοποθετείται μία σταγόνα ορού και προστίθεται εναιώρημα γνωστών ερυθρών ομάδας Β.
- Στο 6<sup>ο</sup> σωληνάριο τοποθετείται μία σταγόνα ορού και προστίθεται εναιώρημα γνωστών ερυθρών ομάδας Ο.

Ανακίνηση των σωληναρίων και φυγοκέντρωση για 15"-30" σε 1000 στροφές/λεπτό.

Ανακίνηση εκ νέου των σωληναρίων και μακροσκοπική ανάγνωση.

### Συμπέρασμα

Η τυχόν συγκόλληση δηλώνει την ύπαρξη του αντίστοιχου αντισώματος στον ορό ή το πλάσμα και το αποτέλεσμα θεωρείται θετικό. Σε αντίθετη περίπτωση το αποτέλεσμα θεωρείται αρνητικό. Η μέθοδος είναι αρκετά αξιόπιστη.

Ερυθρά ομάδας Α ελέγχονται περαιτέρω με την ειδική αντι-Α<sup>1</sup> λεκτίνη για να ταυτοποιηθούν αν ανήκουν στην ομάδα Α<sup>1</sup> ή Α<sup>2</sup>. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ίδια με αυτή του συστήματος ΑΒΟ.

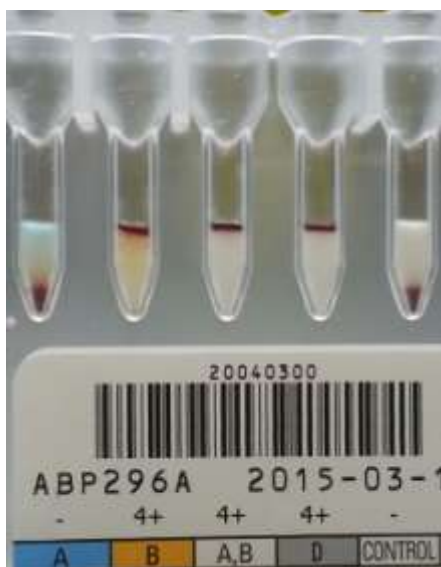
Σημείωση: οι αντιοροί φυλάσσονται πάντα στους 4<sup>ο</sup> C και φέρουν ημερομηνία λήξεως. Πριν τη χρήση τους καλό είναι να παραμένουν για 20 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος γιατί η επαναφορά τους σε κατάλληλα επίπεδα θερμοκρασίας ενισχύουν τη συνένωση αντιγόνου-αντισώματος.

### **3.3 Προσδιορισμός των αντιγόνων Α, Β και D με την μέθοδο μικροσωληναρίων γέλης**

#### Μέθοδος Γέλης:

Είναι μία μέθοδος με αυξημένη ευαισθησία και αποτελείται από μικροσωληνάκια τα οποία περιέχουν γέλη με εμποτισμένους αντιορούς (π.χ. αντι-Α, αντι-Β, αντι-ΑΒ και αντι-D ή και άλλους). Σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας οι κάρτες πριν την χρήση παραμένουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10 λεπτά τουλάχιστον. Ετοιμάζεται εναιώρημα ερυθροκυττάρων του δείγματος και αφού σημειωθεί η κάρτα με τα στοιχεία του ασθενή, τοποθετείται το

εναιώρημα, σε όλα τα μικροσωληνάκια. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 10 λεπτά (σε ειδική φυγόκεντρο). Η ανάγνωση και αξιολόγηση του αποτελέσματος γίνεται σύμφωνα με την παρουσία ή την απουσία ερυθρών στον πυθμένα των μικροσωληναρίων και εκφράζεται σε σταυρούς (+, ++, +++, +++++ ). Θετικό χαρακτηρίζεται το αποτέλεσμα, όταν το σύμπλεγμα αντιγόνου-συντισώματος σχηματίζει μία κόκκινη στοιβάδα στην επιφάνεια της γέλης. Αρνητικό χαρακτηρίζεται το αποτέλεσμα, όταν τα ερυθροκύτταρα καθιζάνουν στον πυθμένα των μικροσωληναρίων (Εικ. 42). Για την επιβεβαίωση του προσδιορισμού των ομάδων αίματος υπάρχουν αντίστοιχες κάρτες μικροσωληναρίων, όπου σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας προσδιορίζουμε τα αντισώματα στον ορό του δείγματος. Δεν θα πρέπει ακόμα να παραληφθεί ο ρόλος της πληροφορικής τεχνολογίας σε αυτοματοποιημένα συστήματα. Οι αυτόματοι αναλυτές διαθέτουν γραμμωτούς κώδικες (bar codes) για αυτόματη αναγνώριση των δειγμάτων και η καταγραφή των αποτελεσμάτων γίνεται μέσω υπολογιστών. Οι αναλυτές αυτοί, που στηρίζονται σε νέες τεχνολογίες, παρέχουν αντικειμενικότητα, ταχύτητα, επαναληψιμότητα και ασφάλεια [90].



**Εικόνα 42:** Προσδιορισμός της ABO ομάδας του ασθενούς χρησιμοποιώντας την τεχνική γέλης. Το A αντιγόνο σαφώς απουσιάζει (αξιολόγηση του αποτελέσματος ως - ). Η συγκόλληση του Αντι-B αντιορού με το B αντιγόνο ήταν κανονικός (4+). Το ίδιο ισχύει και για τον αντιορό αντι-AB (4+). Ασθενής ομάδας αίματος B+.

#### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Γονοτύπηση των ερυθρών κυττάρων και το μέλλον του προμεταγγισιακού ελέγχου.**

Τα τελευταία 20 χρόνια, οι μοριακές βάσεις σχεδόν όλων των βασικών αντιγόνων που καθορίζουν την ομάδα αίματος έχουν καθοριστεί. Αυτή η έρευνα επέτρεψε την ανάπτυξη μεθόδων που βασίζονται στο DNA για τον προσδιορισμό του γονότυπου της ομάδας αίματος. Η πιο αξιοσημείωτη εφαρμογή αυτών των μεθόδων με βάση το DNA έχει εφαρμοστεί για τον προσδιορισμό της ομάδας αίματος του εμβρύου σε εγκυμοσύνες όταν το έμβρυο βρίσκεται σε κίνδυνο να εμφανίσει αιμολυτική νόσο. Η αντικατάσταση όλων των συμβατικών ορολογικών μεθόδων για τον προμεταγγισιακό έλεγχο με μοριακές μεθόδους δεν είναι απλή. Για την πλειοψηφία των προς μετάγγιση ασθενών, ο έλεγχος συμβατότητας για τον ABO και D τύπο είναι αρκετό. Η μειοψηφία των μη μεταγγισμένων ασθενών με ρίσκο εμφάνισης αλλοανοσοποίησης, οι οποίοι θα ωφεληθούν περισσότερο από την εκτενώς ταυτοποίηση της ομάδας αίματος και αντιστοίχιση με συμβατό αίμα δεν μπορούν να αναγνωριστούν αξιόπιστα. Ακόμη και αν ήταν διαθέσιμη μια μέθοδος για τον εντοπισμό ατόμων που είναι πιο πιθανό να αναπτύξουν αλλοαντισώματα, αυτή από μόνη της δεν θα μπορούσε να εγγυηθεί την παροχή εκτεταμένα φαινοτυπημένου συμβατού αίματος για αυτούς τους ασθενείς, διότι αυτό καθορίζεται από το μέγεθος και τη φυλετική σύνθεση του εθελοντικού αίματος που διατίθενται για μετάγγιση. Εντούτοις, μια συνήθης χρήση της βασιζόμενης στο DNA μεθόδου, για την παροχή εκτεταμένα φαινοτυπημένου αίματος από κάποιο δότη, που να ταιριάζει ιδανικά σε ασθενείς με προϋπάρχοντα αντισώματα ή σε ασθενείς με γνωστή προδιάθεση προς αλλοανοσοποίηση, όπως εκείνοι με δρεπανοκυτταρική ασθένεια, χρησιμοποιείται ευρέως [91].

Περισσότερα από 300 κληρονομούμενα είδη αντιγόνων ομάδων αίματος έχουν περιγραφεί στην επιφάνεια των ανθρώπινων ερυθρών κυττάρων[9, 92]. Με σπάνιες εξαιρέσεις, αυτά τα αντιγόνα πρώτο ανακαλύφθηκαν από την ανίχνευση αντισωμάτων, ειδικών για αυτά τα αντιγόνα, που υπάρχουν στον ανθρώπινο ορό με τη χρήση της μεθόδου συγκόλλησης. Λιγότερα από 50 από αυτά τα αντιγόνα ομάδας αίματος είναι γνωστό ότι είναι πολυμορφικά, σε κάθε περιοχή του κόσμου. Αυτό σημαίνει, το να έχουμε εναλλακτικά αλληλόμορφα παρόντα σε ένα πληθυσμό σε μεγαλύτερα επίπεδα από όσα μπορούν να διατηρηθούν επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις [93].

Από αυτά τα αντιγόνα που είναι πολυμορφικά, μερικά διεγείρουν αντισώματα κλινικής σημασίας προκαλώντας αντιδράσεις κατά την μετάγγιση ή αιμολυτική νόσο στο έμβρυο και στο νεογέννητο (HDFN)[94]. Συνεπώς, ασφαλή μετάγγιση για τους περισσότερους παραλήπτες(δέκτες αίματος-ασθενείς) μπορεί να εξασφαλιστεί με την ορθή ταυτοποίηση των ασθενών και των δοτών σε σχέση με το είδος ABO φαινοτύπου τους και με την πραγματοποίηση screening test στον ορό των ασθενών για την ανίχνευση κλινικά σημαντικών αντισωμάτων που στρέφονται εναντίον πολυμορφικών αντιγόνων στον τοπικό πληθυσμό. Σε πληθυσμούς στους οποίους το αντιγόνο RhD είναι πολυμορφικό, είναι αποδεκτή πρακτική να ταυτοποιούνται όλοι οι δωρητές και αποδέκτες αίματος ως προς τον φαινότυπο RhD, επειδή το αντι-D αντίσωμα εμφανίζεται συχνά στον ορό του ασθενούς, και αυτό είναι μια σημαντική αιτία της HDFN και των αντιδράσεων μετάγγισης. Στην Άπω Ανατολή, όπου ο D-αρνητικός φαινότυπος είναι ασυνήθιστος και το αντι-D είναι σπάνιο, ο έλεγχος του RhD φαινοτύπου μπορεί να μην είναι αναγκαίος [95]. Οι διαδικασίες “type and screen” έχουν την αδυναμία ότι αντισώματα έναντι σπάνιων πολυμορφικών αντιγόνων δεν ανιχνεύονται (περίπου το 0,06% των περιπτώσεων), αλλά τα αντισώματα που χάνονται είναι σπάνια κλινικά σημαντικά [96, 97]. Μια περαιτέρω διαπίστευση εκ νέου για τους ασθενείς χωρίς σπάνια αντισώματα είναι η διασταύρωση των αποτελεσμάτων με αυτά του υπολογιστή μέσω ενός ενσωματωμένου λογισμικού, παρέχοντας έτσι κατάλληλες δικλίδες ασφαλείας για την αποτροπή θεμάτων σχετικών με ABO ασυμβίβαστο αίμα [98]. Τα τελευταία 30 χρόνια έχει υπάρξει μια τάση στις τράπεζες αίματος για τη μείωση της ποσότητας αίματος που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο συμβατότητας πριν την μετάγγιση του ασκού και στην εισαγωγή τροποποιημένων εκδοχών των δοκιμασιών συγκόλλησης, όπως η δοκιμασία τζελ που μπορεί να εκτελεστεί με ασφάλεια από το προσωπικό του εργαστηρίου χωρίς εκτεταμένη πρακτική εξάσκηση στις παραδοσιακές ορολογικές μεθόδους [99]. Οι διαδικασίες αυτές είναι απολύτως αποδεκτές για τους περισσότερους δέκτες μετάγγισης, αλλά πιο εκτεταμένος έλεγχος συμβατότητας πριν την μετάγγιση του αίματος του δότη για ασθενείς με παθήσεις που έχουν υψηλό κίνδυνο αλλοανοσοποίησης (δρεπανοκυτταρική αναιμία, θαλασσαιμία) είναι επιθυμητός και έχει γίνει κοινή πρακτική σε πολλά εργαστήρια [100, 101]. Τα τελευταία χρόνια οι εθνικές διαδικασίες αιμοεπαγρύπνησης έχουν επιβεβαιώσει την ακρίβεια αυτών των ορολογικών μεθόδων, και το επίκεντρο της προσπάθειας για την αύξηση της ασφάλειας των μεταγγίσεων έχει μετακινηθεί από τις εργαστηριακές

μεθόδους στην αποφυγή των σφαλμάτων που εμφανίζονται αφού το αίμα έχει εγκαταλείψει την τράπεζα αίματος [102, 103].

Παράλληλα με την τάση μείωσης της ποσότητας και της πολυπλοκότητας των δοκιμασιών πριν την μετάγγιση, έντονη ερευνητική δραστηριότητα έχει κατευθυνθεί προς τον μοριακό χαρακτηρισμό των γονιδίων της ομάδας αίματος και τον καθορισμό της μοριακής βάσης των πολυμορφισμών της ομάδας αίματος [104]. Η γνώση που έχει ληφθεί έδωσε τη δυνατότητα μιας νέας προσέγγισης του προσδιορισμού των αντιγόνων της ομάδας αίματος, με βάση τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA και όχι μέσω της μεθόδου συγκόλλησης. Μέθοδοι με βάση το DNA έχουν την θεμελιώδη αδυναμία να μην ανιχνεύουν άμεσα την παρουσία ενός αντιγόνου επί της επιφανείας του ερυθροκυττάρου. Παρόλα αυτά, υπάρχουν αρκετές κλινικές καταστάσεις στις οποίες αυτή η προσέγγιση έχει αποδειχθεί ότι είναι μια πολύτιμη προσθήκη στο φάσμα των διαθέσιμων μεθόδων προσδιορισμού της ομάδας αίματος. Αυτό το άρθρο εξετάζει την επίδραση των μεθόδων που βασίζονται στο DNA και έχουν ήδη γίνει για την παροχή της υγειονομικής περίθαλψης στην μεταγγισιακή και νεογνική ιατρική και θεωρεί ότι η επέκταση αυτών των μοριακών μεθόδων είναι πιθανό να επηρεάσουν τις υπάρχουσες συνήθειες εργαστηριακές διαδικασίες στον προμεταγγισιακό έλεγχο.

#### **4.1 Γονίδια της ομάδα αίματος που κωδικοποιούν πολυμορφικά αντιγόνα συνήθως διεγείρουν αντισώματα κλινικής σημασίας.**

Για να επιτευχθεί ασφαλή μετάγγιση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, πρέπει να ικανοποιούνται ως προς τη συμβατότητα 3 μεγάλες κατηγορίες ομάδας αίματος. Πρώτον, και πιο σημαντικό, τα ερυθρά αιμοσφαίρια για να μεταγγισθούν πρέπει να είναι συμβατά με το σύστημα ABO. Δεύτερον, RhD-θετικά ερυθρά αιμοσφαίρια δεν πρέπει να χορηγούνται σε γυναίκες με φαινότυπο RhD-αρνητικό. Τρίτον, τα προς μετάγγιση ερυθρά κύτταρα θα πρέπει να στερούνται αντιγόνων ομάδας αίματος που αντιδρούν με κάθε προϋπάρχον κλινικά σημαντικό αντίσωμα που ο ασθενής μπορεί να έχει. Οι βασιζόμενοι στο DNA μέθοδοι για τον προσδιορισμό των αντιγόνων των συστημάτων ABO, RhD, και άλλων συστημάτων που μπορεί να προκαλέσουν την παραγωγή κλινικά σημαντικών αντισωμάτων, μπορεί να θεωρηθούν επαρκώς ισχυροί ώστε να αντικαταστήσουν τις υπάρχουσες ορολογικές μεθόδους για τις δοκιμασίες πριν την μετάγγιση? [91]

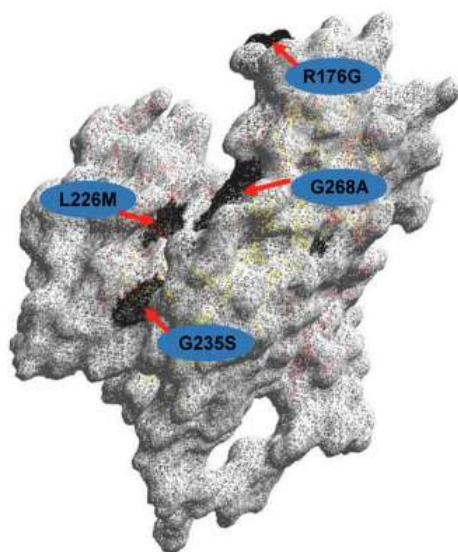
## 4.2 Προβλήματα που προκύπτουν από τον προσδιορισμό του συστήματος ABO με μεθόδους που βασίζονται στο DNA.

Το σύστημα ομάδων αίματος ABO είναι το πιο σημαντικό κλινικά σύστημα, επειδή τα αντισώματα εναντίον των A ή B ή αμφοτέρων αντιγόνων είναι φυσικά παρόντα στον ορό των ατόμων των οποίων τα ερυθροκύτταρα εκφράζουν στην επιφάνειά τους αντιγόνα τύπου B, A ή O κάθε φοιτητής της ιατρικής μαθαίνει γρήγορα ότι ασυμβατότητα στο σύστημα ABO κατά την μετάγγιση είναι δυνητικά θανατηφόρα. Επομένως, παγκοσμίως ο προσδιορισμός της ομάδας αίματος με μεθόδους βασισμένες στο DNA, δεν μπορούν από μόνες τους να ληφθούν υπόψιν ελλείψει μιας εντελώς ισχυρής μεθόδου για τον προσδιορισμό του ABO φαινοτύπου. Η μοριακή βάση του συστήματος ABO ομάδας αίματος είχε διευκρινιστεί από το 1990<sup>15</sup>. Όπως έχει ξαναειπωθεί ο ABO φαινότυπος ενός ατόμου καθορίζεται από την έκφραση ενός απλού γονιδίου γλυκοζυλοτρανσφεράσης στο χρωμόσωμα 9. Η τρισδιάστατη δομή της B-τρανσφεράσης διαλευκάνθηκε από τους Patanaude et.al (Εικ.43)[105]. Τα αντιγόνα A, B, και οι παραλλαγές-αλληλόμορφα τους προκύπτουν από λειτουργικά γονίδια γλυκοζυλοτρανσφεράσης ικανά να μεταφέρουν N-ακετυλ-D-γαλακτοζαμίνη ή D-γαλακτόζη ή και τα δύο σε μη αναγωγικά άκρα κατάλληλων ολιγοσακχαριτικών αλυσίδων που βρίσκονται σε γλυκοπρωτεΐνες και γλυκολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθροκυττάρων. Ο φαινότυπος των ερυθροκυττάρων που συμβολίζεται με O συμβαίνει επειδή το γονίδιο της γλυκοσυλτρανσφεράσης, που δημιουργεί A ή B ή και τα δύο αντιγόνα, είναι ανενεργό. Το γεγονός ότι η ομάδα O είναι αποτελέσματα ενός ανενεργού γονιδίου δημιουργεί μείζον και θεμελιώδες πρόβλημα στο σχεδιασμό μεθόδων προσδιορισμού της ABO ομάδας αίματος, που βασίζονται στο DNA, επειδή μεταλλάξεις που προκαλούν απενεργοποίηση συμβαίνουν σε πολλά διαφορετικά σημεία στην κωδικοποιούσα περιοχή του ABO γονιδίου δημιουργώντας πολλούς τύπους O φαινοτύπου. Το πιο κοινό O αλληλόμορφο ( $O^1$ ) διαχωρίζεται από το  $A^1$  αλληλόμορφο λόγω της διαγραφής του G νουκλεοτιδίου στη θέση 261 η οποία δημιουργεί μια μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης που έχει ως αποτέλεσμα την μετάφραση μιας κομμένης πρωτεΐνης 117 αμινοξέων που στερείται μία ενεργό θέση του ενζύμου. Αντίθετα το  $O^2$  αλληλόμορφο έχει 6 SNPs που διαφέρουν από του  $A^1$  αλληλομόρφου. Το πιο σημαντικό μεταξύ των SNPs (G802A) οδηγεί σε μια

αμινοξική αντικατάσταση Gly268Arg στη δραστική θέση του ενζύμου, καθιστώντας την αδρανής [106] (Εικ. 43). Το O<sup>3</sup> αλληλόμορφο έχει μια προσθήκη G νουκλεοτιδίου στη θέση 804, προκαλώντας μια μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης που αλλάζει την αλληλουχία της πρωτεΐνης στο κατάλοιπο 269 εντός της δραστικής θέσης του ενζύμου. Το O<sup>4</sup> αλληλόμορφο έχει μια προσθήκη G νουκλεοτιδίου στη θέση 88 που καταλήγει σε μια μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης και σε μια κομμένη ανενεργή πρωτεΐνη 56 αμινοξέων. Τα O<sup>5</sup> και O<sup>6</sup> αλληλόμορφα έχουν νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις στις θέσεις C322T και G542A, αντίστοιχα, οι οποίες δημιουργούν κωδικόνια λήξης που οδηγούν σε ανενεργές πρωτεΐνες μήκους 107 και 181 καταλοίπων αντίστοιχα.

Όλες αυτές οι μεταλλάξεις που οδηγούν σε διαφορετικά αλληλόμορφα του O φαινοτύπου συμβαίνουν στην αλληλουχία του A<sup>1</sup> αλληλομόρφου, έτσι κάθε μέθοδος με βάση το DNA που δεν έχει σχεδιαστεί για να επιλέξει όλα τα αλληλόμορφα O μπορεί λανθασμένα να προσδιορίσει το δείγμα ως A<sup>1</sup>. Προφανώς, αυτό είναι ένα σημαντικό πρόβλημα λόγω του κινδύνου εσφαλμένου προσδιορισμού του δέκτη αίματος ως A όταν αυτός ή αυτή είναι στην πραγματικότητα O, μια ασύμβατη μετάγγιση είναι δεδομένη σε αυτή τη περίπτωση. Οι Storry et al περιέγραψαν μια τέτοια περίπτωση [107]. Ένας δότης νεφρού προσδιορίστηκε ως A τύπος αίματος με μεθόδους που βασίζονται στο DNA, αλλά συμβατικά οι ορολογικές δοκιμασίες έδειξαν ότι ο δότης είναι ομάδα O με αντι-A και αντι-B αντισώματα στον ορό του. Δύο πρόσφατες μελέτες παρέχουν μια περιεκτική συζήτηση για τα μεθοδολογικά προβλήματα που ενυπάρχουν στο προσδιορισμό της ABO ομάδας αίματος, με βάση το DNA, ιδίως σε σχέση με τους γνωστούς O γονότυπους [108, 109].

Η γνώση των διαφόρων μοριακών βάσεων της ομάδας με O φαινότυπο σε διαφορετικό πληθυσμό επιτρέπει την ανάπτυξη των αναλύσεων DNA, ικανή να ανιχνεύει όλα τα γνωστά αλληλόμορφα, αλλά δεν μπορεί να επιτρέψει την αναγνώριση νέων μεταλλάξεων αδρανοποίησης που δεν έχουν παρατηρηθεί ακόμα. Κατά συνέπεια, θα υπάρχει πάντα η πιθανότητα μιας περιστασιακής ABO ασύμβατης μετάγγισης εάν τέτοιες μέθοδοι χρησιμοποιούνται για να αντικαταστήσουν καθιερωμένες διαδικασίες. Ένας τρόπος για την ελαχιστοποίηση των κινδύνων θα ήταν πρόσθετες δοκιμές όλων των δειγμάτων για την παρουσία αντι-A και αντι-B, αλλά ακόμα κι έτσι είναι δύσκολο να δούμε πώς οι μέθοδοι με βάση το DNA θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε περιπτώσεις απουσίας των συμβατικών ορολογικών μεθόδων για επιβεβαίωση του ABO φαινοτύπου.



**Εικόνα 43:** Δομή της ABO γλυκοσυλτρανσφεράσης. Κατάλοιπα αμινοξέων που διαφέρουν μεταξύ της ομάδας αίματος A και B-ενεργό τρανσφεράσης, αντίστοιχα (Arg176Gly, Gly235Ser, Leu266Met, Gly268Ala) εμφανίζονται με τον κώδικα ενός γράμματος και οι θέσεις τους υποδεικνύονται. Το τρισδιάστατο μοντέλο δημιουργήθηκε με το ελβετικό DeepView Pdb. Viewer έκδοση 3.7.

### **4.3 Εφαρμογές της γονοτύπισης των ερυθροκυττάρων στην καθημερινή πρακτική των μεταγγίσεων.**

Υπάρχουν αρκετές καθιερωμένες και χρήσιμες εφαρμογές για τον προσδιορισμό των γονοτύπων των ερυθροκυττάρων με βάση το DNA, στην μεταγγισιακή και νεογνική ιατρική (όπως ανέφεραν οι Westhoff [110] και Hillyer et al.[111], συνοψίζονται στον πίνακα 12). Η εξακρίβωση του εμβρυικού DNA, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για περισσότερο από μια δεκαετία και είναι αποδεδειγμένα χρήσιμο στην διαχείριση του HDFN (έχει συζητηθεί η συμβολή της DNA μεθόδου προσδιορισμού των Rh αντιγόνων, στην αιμολυτική νόσο του νεογνού)

Άλλες εφαρμογές των DNA μεθόδων περιλαμβάνουν τον καθορισμό του γονοτύπου των ερυθροκυττάρων των ασθενών που έχουν λάβει πολλές μεταγγίσεις ή έχουν αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία σύμφωνα με την οποία η συμβατική ορολογική εξέταση δεν είναι μια αξιόπιστη μέθοδος για τον προσδιορισμό της ομάδας αίματος των ασθενών.

Ο εκτεταμένος έλεγχος για τον εντοπισμό δωρητών με σπάνιες ομάδες αίματος ή ο καθορισμός της συχνότητας των πολυμορφισμών των ομάδων αίματος σε ένα δεδομένο πληθυσμό είναι χρήσιμες εφαρμογές που μπορεί να επιτευχθούν με ένα υψηλής απόδοσης αυτοματοποιημένο σύστημα[112, 113].

**Πίνακας 12:** Χρήσιμες εφαρμογές της γονοτύπησης των ερυθρών κυττάρων στην ιατρική των μεταγγίσεων.

|                                                                                        |
|----------------------------------------------------------------------------------------|
| Προσδιορισμός εμβρυικού DNA                                                            |
| Εκτεταμένος προσδιορισμός της ομάδας αίματος των δοτών για αλλοανοσοποιημένους ασθενής |
| Καθορισμός της ομάδας αίματος ενός πρόσφατα μεταγγισμένου ασθενή                       |
| Έλεγχος του αίματος των δοτών για φαινοτύπηση σπάνιων αντιγόνων                        |
| Καθορισμός της συχνότητας των πολυμορφισμών των ομάδων αίματος σε έναν πληθυσμό        |
| Καθορισμός της RHD ζυγωτίας των πατέρων των εμβρύων σε περίπτωση κινδύνου για HDFN     |
| Προσδιορισμός της ομάδας αίματος ασθενών με αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία               |

Ωστόσο, σημαντικά προβλήματα αποκλείουν οποιαδήποτε σκέψη περί αντικατάστασης όλων των ορολογικών διαδικασιών προσδιορισμού της ομάδας αίματος με DNA μεθόδους. Εξάλλου στο θεμελιώδες πρόβλημα που θέτει ο καθορισμός της ομάδας Ο φαινοτύπου, τα γονίδια που κωδικοποιούν κάποια κοινά μη πολυμορφικά αντιγόνα (Vel;Jr<sup>a</sup>;At<sup>a</sup>;MAM;AnWj), τα οποία προκαλούν ενίοτε την παραγωγή κλινικά σημαντικών αντισωμάτων, δεν έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί. Ως εκ τούτου, δεν είναι δυνατή η χρήση μοριακών μεθόδων για την ανίχνευση της απουσίας αυτών των αντιγόνων και ούτε ο προσδιορισμός ατόμων που μπορεί να έχουν κλινικά σημαντικά αντισώματα. Αυτά τα αντισώματα είναι πολύ σπάνια, αλλά μπορεί να προκαλέσουν σοβαρές αντιδράσεις κατά την μετάγγιση και HDFN. Ως εκ τούτου, η εισαγωγή των DNA μεθόδων προσδιορισμού της ομάδας αίματος θα πρέπει να γίνει παράλληλα με τις συμβατικές μεθόδους προσδιορισμού του ABO και τον έλεγχο για ύπαρξη αντισωμάτων και όχι ξεχωριστά. Δεδομένης της ευκολίας των συμβατικών μεθόδων για τον προσδιορισμό του D τύπου, θα πρέπει να είναι σημαντικά τα πλεονεκτήματα, πέρα από το όφελος που απορρέει από την

αναγνώριση ορισμένων δυνητικά ανοσογονικών αντιγόνων D-τύπου, για να εισαχθούν πιο δαπανηρές DNA μέθοδοι στην καθημερινή διαδικασία ρουτίνας [91].

Μια υψηλής απόδοσης αυτοματοποιημένη μέθοδος DNA προσδιορισμού της ομάδας αίματος θα επέτρεπε καταρχάς την λήψη, από όλους τους προς μετάγγιση ασθενείς, του πιο συμβατού ως προς την ομάδα αίματος αίμα που διατίθενται από τα κέντρα αίματος. Ωστόσο η πιο συμβατή ομάδα αίματος με το αίμα που είναι διαθέσιμο είναι απίθανο να ταιριάζει με τους γονότυπους των ασθενών σε περισσότερες από 3 ή 4 περιοχές της ομάδα αίματος, λόγω των περιορισμών των αποθεμάτων, ακόμη και σε χώρες με αίματα σε υπηρεσίες που συλλέγουν εκατομμύρια δότες σε ένα χρόνο. Σε κάθε περίπτωση δεν έχει κανένα νόημα να επιχειρηθεί μια τέτοια συνολική υπηρεσία αντιστοίχισης, δεδομένου ότι λιγότερο από το 10% των δικαιούχων μετάγγισης κάνουν αλλοαντισώματα με τις ήδη τρέχουσες διαδικασίες συμβατότητας[114, 115]. Διαθέσιμα στοιχεία υποστηρίζουν την άποψη ότι η ικανότητα ενός ατόμου να κάνει αλλοαντισώματα έναντι των αντιγόνων των ομάδων αίματος καθορίζεται γενετικά[115]. Σαφώς, υπάρχει μία ανάγκη για DNA μεθόδους που να επιτρέπουν τον εντοπισμό των ασθενών που είναι πιθανότερο να κάνουν αντισώματα ως απόκριση σε μια μετάγγιση. Εάν τέτοιες μέθοδοι ήταν διαθέσιμες, τότε μπορεί να ήταν εφικτό να στοχευθεί αυτό το μικρό υποσύνολο ασθενών («ανταποκριτές»), έτσι ώστε να λαμβάνουν τα πιο συμβατά, ως προς την ομάδα αίματός τους, αίματα που είναι διαθέσιμα, ενώ οι ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται με τέτοιο τρόπο κατά την μετάγγιση θα λαμβάνουν συμβατό αίμα ως προς τα συστήματα ABO και D με τον συμβατικό τρόπο. Οι Higgins και Sloan[115] υποστήριξαν ότι, επειδή οι ασθενείς που έχουν ήδη κάνει αλλοαντίσωμα είναι ανταποκριτές και είναι πολύ πιθανό να κάνουν περαιτέρω αντισώματα, θα ήταν λογικό να διαθέσουμε σε αυτή την ομάδα ασθενών όσο πιο πληρέστερα προσδιορισμένες μονάδες, οι οποίες ομάδες θα περιλαμβάνουν ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία και γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας.

Η εκτεταμένη προφυλακτική γονοτύπιση ερυθροκυττάρων για την επιλογή κατάλληλων δοτών για ασθενείς οι οποίοι θα λάβουν επαναλαμβανόμενες μεταγγίσεις για μεγάλο χρονικό διάστημα θα ήταν μια ελκυστική εφαρμογή με βάση το DNA για τον προσδιορισμό της ομάδας αίματος. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για ασθενείς με δρεπανοκυτταρική νόσο, στους οποίους το ποσοστό αλλοανοσοποίησης είναι υψηλό [116]. Μια πρόσφατη έρευνα του 1182 στα εργαστήρια της Βόρειας Αμερικής έδειξε ότι τα περισσότερα εργαστήρια (n.743)

προσδιόρισαν μόνο τον τύπο της ABO και D ομάδας των ασθενών με δρεπανοκυτταρική αναιμία. Τα περισσότερα εργαστήρια που πραγματοποίησαν πιο εκτεταμένη φαινοτύπηση (ν.330) προσδιόρισαν τον τύπο C, E, και K που είχαν οι ασθενείς [117]. Η προφυλακτική συμβατότητα για ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία με τη χρήση DNA μεθόδων δεν απαιτεί κατ'ανάγκη τη χρήση εκτεταμένων DNA συστοιχιών (τσιπ γονιδίων). Κατ'αρχήν, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί στην τράπεζα αίματος με τη χρήση ενός συνδυασμού συμβατικών ορολογικών μεθόδων (για τον προσδιορισμό ABO και Rh ομάδα) και μίας DNA μεθόδου που χρησιμοποιεί σφαιρίδια ή μικροσφαίρες για αντιγόνα άλλων ομάδων αίματος (Karpasitou et al[118], Εικ. 44). Ωστόσο, αυτή η εφαρμογή της γονοτύπησης των ερυθροκυττάρων έχει επίσης περιορισμούς. Οι Castro et al. σε μια μελέτη 137 αλλοανοσοποιημένων ασθενών με δρεπανοκυτταρική αναιμία επισήμαναν ότι, όταν χρησιμοποιούταν για συμβατότητα αίμα με περιορισμένο προσδιορισμένο φαινότυπο (στο Cc, Ee, K επιπροσθέτως της ABO και D ομάδας), όλα τα αλλοαντισώματα θα είχαν αποφευχθεί για περισσότερο από το ήμισυ (53.3%) των ασθενών[119]. Εάν η φαινοτύπηση είχε επεκταθεί για να συμπεριλάβει τον προσδιορισμό των αντιγόνων S, Fy<sup>a</sup>, και Jk<sup>b</sup>, όλα τα αλλοαντισώματα θα είχαν αποφευχθεί στο 70,8% των ασθενών, αλλά, ωστόσο μόνο το 13,6% των λευκών τυχαίων δοτών κυττάρων αίματος θα ταίριαζε με τον περιορισμένο φαινότυπο, και μόνο το 0,6% θα ταίριαζε με τον εκτεταμένο φαινότυπο. Συνδυάζοντας τους Αφροαμερικανούς δότες με εκείνους που έχουν φαινότυπο Fy (a-b-) με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων αντι-Fy3, στο 12% των δοτών είχαμε επέκταση των συμβατών φαινοτύπων για 41 ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία [120]. Olujohungbe et al. ανέφεραν πολύ υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης αλλοανοσοποίησης σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία στο Ηνωμένο Βασίλειο ( 76% εκείνων που δέχονταν μετάγγιση) σε σύγκριση με μια συγκρίσιμη ομάδα στην Τζαμάικα (2,6% εκείνων που δέχονταν μετάγγιση), δίνοντας περαιτέρω έμφαση στις συνέπειες της ανισότητας μεταξύ δότη και ληφθέν πληθυσμού [121]. Σαφώς, η χρησιμότητα των DNA μεθόδων προσδιορισμού της ομάδας αίματος για τη μείωση της αλλοανοσοποίησης στους δωρητές με δρεπανοκυτταρική αναιμία, περιορίζεται από τη διαθεσιμότητα συμβατών αιμάτων.

#### **4.4 Η μοριακή συμβατότητα των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι ανώτερη της ορολογικής σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία.**

Σε μία άλλη μελέτη μονάδες ερυθρών αιμοσφαιρίων ερευνήθηκαν για την ύπαρξη διαφόρων παραλλαγών στα αντιγονικά συστήματα ABO, D, C, C, E, E, K, Fya, Fyb, Jka, Jkb, S, S, Dia και RH εκτελώντας μια μοριακή σειρά (Αντιγόνα από ανθρώπινα ερυθροκύτταρα BeadChip™, BioArray Solutions), μια PCR ακολουθούμενη από μια ανάλυση RFLP και την αλληλούχηση (sequencing) των δειγμάτων των ασθενών και των μονάδων των δοτών που είχαν βγει συμβατές με βάση ορολογικές μεθόδους που βασίζονταν στην φαινοτύπηση των ABO, Rh και K και στην παρουσία αντισωμάτων [122].

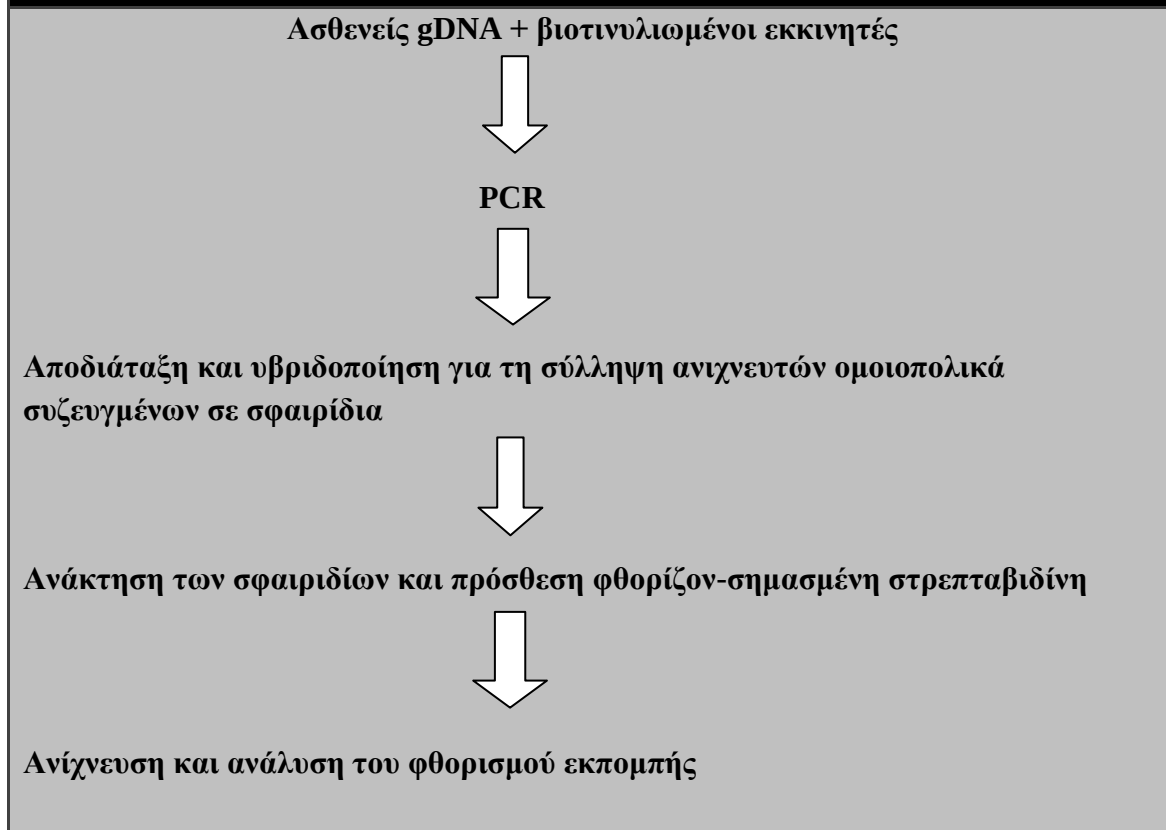
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα οι συμβατότητες για τους 21 από τους 35 ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία παρουσιάζουν αποκλίσεις ή αναντιστοιχίες για πολλαπλά αντιγόνα μεταξύ του προφίλ του γονότυπου και του προφίλ του αντιγόνου του ορολογικά συμβατών μονάδων αίματος τους. Οι κύριες διαφορές ή αναντιστοιχίες συνέβησαν στα συστήματα RH, FY, JK και MNS. Οκτώ Rh αλλοανοσοποιημένοι ασθενείς παρουσίασαν RHD και RHCE παραλλαγές που δεν είχαν εντοπιστεί ορολογικά. Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα καλύτερη αντιστοιχία βρέθηκε για τους ασθενείς με γονοτυπημένες μονάδες αίματος και οι ασθενείς ωφελήθηκαν, όπως φαίνεται από την καλύτερη in vivo επιβίωση των ερυθρών κυττάρων του αίματος.

Έτσι καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η μοριακή αντιστοίχιση είναι ανώτερη από την ορολογική σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική νόσο, μειώνοντας το κίνδυνο των αντιδράσεων μετάγγισης, ειδικά των καθυστερημένων αντιδράσεων μετάγγισης σε υπάρχοντα αλλοαντισώματα και στην πρόληψη αλλοανοσοποίησης [122].

#### **4.5 Αφομοίωση της γονοτύπησης των ερυθρών κυττάρων στην καθημερινή πρακτική.**

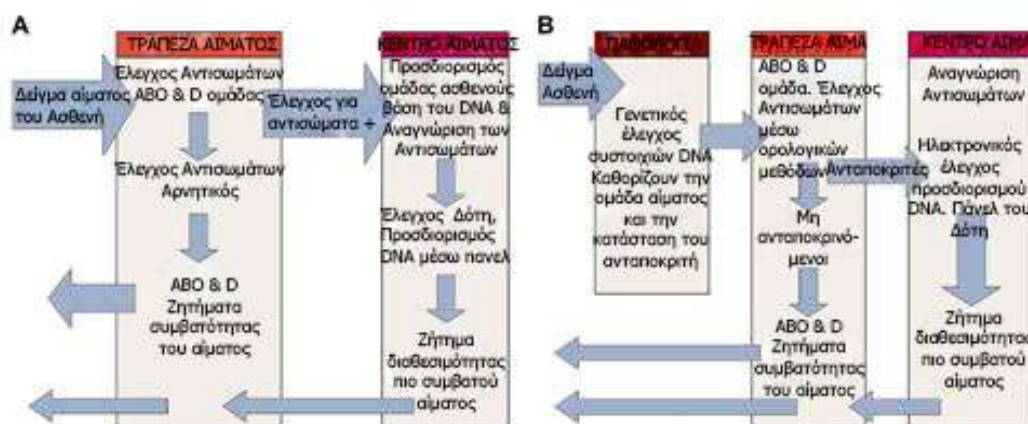
Όπως συζητήθηκε προηγουμένως, η βέλτιστη χρήση της γονοτύπησης των ερυθρών κυττάρων στην καθημερινή πρακτική απαιτεί τον διαχωρισμό μεταξύ των ασθενών που είναι πιθανόν να αναπτύξουν αλλοαντισώματα από αυτούς που είναι απίθανο. Προς το παρόν δεν μπορεί να γίνει αυτή η διάκριση, και έτσι η καλύτερη διαθέσιμη επιλογή είναι να χρησιμοποιήσουμε φαινοτυπημένο αίμα δοτών με βάση το DNA για τους ασθενείς οι οποίοι έχουν προϋπάρχοντα αντισώματα και είναι επομένως αναμενόμενη η ανταποκρισή τους να αναπτύξουν αλλοαντισώματα, όπως ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία. Ένα πιθανό σενάριο για την αφομοίωση της φαινοτύπησης με βάση το DNA σε πρωτόκολλα δοκιμασιών ελέγχου πριν την μετάγγιση απεικονίζεται στην Εικόνα 45Α. Σε αυτό το σενάριο, το δείγμα του ασθενή έχει προσδιοριστεί ως πριν τον ABO και D φαινότυπο από τον έλεγχο των αντισωμάτων με συμβατικές μεθόδους. Εάν το αντίσωμα ανιχνεύεται και αναγνωρίζεται, το DNA του ασθενή τυποποιείται από το προσωπικό της τράπεζας αίματος ή του κέντρου αίματος για άλλες ομάδες αίματος με τη χρήση μιας μεθόδου που είναι παρόμοια με αυτή που απεικονίζεται στην εικόνα 44. Η βάση δεδομένων του κέντρου αίματος που διαθέτει τα φαινοτυπημένα μέσω DNA αίματα των δοτών, αναζητούνται ηλεκτρονικά για να βρεθεί το πιο συμβατό. Στα μεγάλα κέντρα αίματος με μεγάλο αριθμό αιμοδοτών, η αυτόματη τυποποίηση, των αιμάτων που έχουν δοθεί, για πολλαπλές θέσεις της ομάδας αίματος είναι πολύ πιθανόν να διεξάγεται με DNA arrays ή chips γονιδίων.

## Γονοτύπηση των ερυθρών κυττάρων για τα SNPs των ομάδων αίματος



**Εικόνα 44:** Γονοτύπηση των ερυθρών κυττάρων για τα SNPs των ομάδων αίματος. Περιγραφή μιας μεθόδου για τον καθορισμό των SNPs των ομάδων αίματος που βασίζεται σε αυτό ο Karpasitou et al. Πολλές άλλες μέθοδοι είναι διαθέσιμες[111-113]. Αυτή η μέθοδος απεικονίζεται διότι είναι κατάλληλη για την "in-house" ανάπτυξη [113].

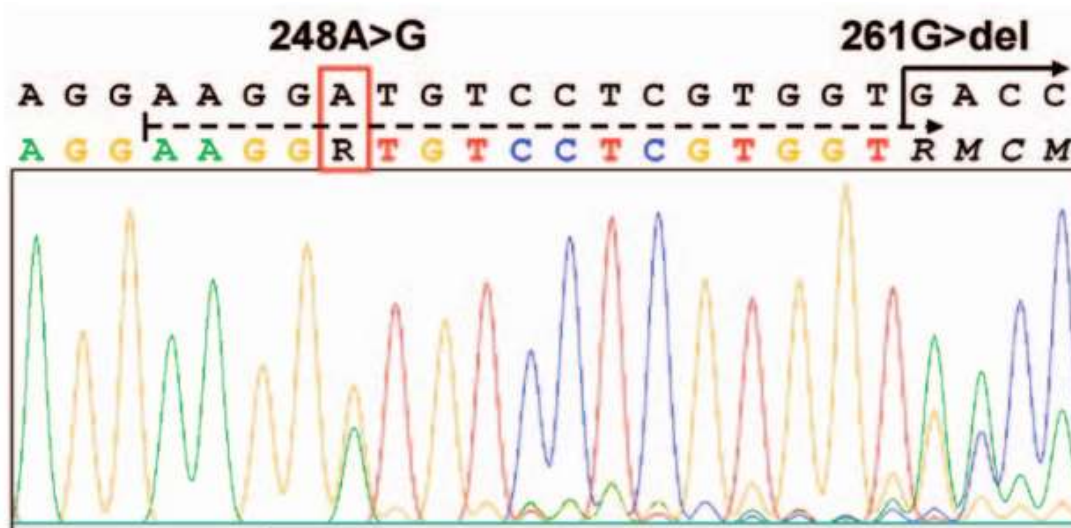
Ένα άλλο σενάριο είναι πιθανό, εάν η χρήση των συστοιχιών DNA για γενετικό έλεγχο για να καθορίσει την ευαισθησία σε κοινές ασθένειες, γίνει μέρος της καθημερινής πρακτικής ρουτίνας σε εργαστήρια παθολογίας. Σε αυτή την περίπτωση θα ήταν εφικτό να περιληφθούν οι αναγκαίες πρόσθετες αντιδράσεις του ασθενούς με την ομάδα αίματος στο ίδιο γονίδιο τσιπ. Το προσωπικό της τράπεζας αίματος θα επιβεβαίωνε την ομάδα αίματος ABO και τον D τύπου του ασθενούς και θα πραγματοποιούσε έναν έλεγχο των αντισωμάτων (antibody screen). Εάν ο έλεγχος των αντισωμάτων ήταν θετικός και τα αντισώματα αναγνωρίζονταν ή καθορίζονταν από την ανταποκρινόμενη κατάσταση, αναζήτηση στη βάση δεδομένων του κέντρου αίματος, των διαθέσιμων δωρητών θα μπορούσε να προχωρήσει άμεσα, διότι ο προσδιορισμός της ομάδας αίματος με βάση το DNA (DNA-based typing) έχει ήδη πραγματοποιηθεί. (Σχήμα 45B).



**Εικόνα 45:** Εξομοίωση των ερυθρών κυττάρων του γονότυπου στη συνήθη πρακτική. (Α) απεικονίζει ένα σενάριο για την ενσωμάτωση των ερυθρών κυττάρων του γονότυπου στη συνήθη πρακτική που βασίζεται στην τεχνολογία που διατίθενται σήμερα. Είναι επίσης δυνατή η εξέταση με βάση το DNA που θα μπορούσε να αναληφθεί από την τράπεζα αίματος ή άλλο εργαστήριο. (Β) απεικονίζει ένα πιθανό μελλοντικό σενάριο, υποθέτοντας γενετικό έλεγχο με συστοιχίες DNA για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας της νόσου που θα γίνει ρουτίνα και ένα γενετικό τεστ που θα επιτρέπει τον εντοπισμό των ασθενών (ανταποκρινόμενοι) που ενδέχεται να αναπτύξουν αλλοαντισώματα έναντι των αντιγόνων των ομάδων αίματος που θα είναι διαθέσιμων.

#### **4.6 Μια καινούργια παραλλαγή του ABO γονιδίου οδηγεί σε αντιφατικά αποτελέσματα της ευθύς/ ανάστροφης και Μοριακής ταυτοποίησης της ομάδας αίματος**

Η εκ νέου αλληλούχιση του ABO εξονίου εντόπισε μια νέα missence μετάλλαξη στο εξόνιο 6 στη θέση 248A> G (Asp83Gly) στην περιοχή σύνδεσης των PCR-SSP εκκινητών ειδικών για την ανίχνευση του 261G αλληλομόρφου. Οι αιμοδοτές με συνηθισμένες ABO ομάδες αίματος ήταν αρνητικοί για το αλληλόμορφο 248G που ορίζεται Aw34. Η νέα παραλλαγή του ABO γονιδίου Aw34 σχετίζεται με πολύ αδύναμη έκφραση του αντιγόνου A και την απουσία ισοσυγκολλητινών αντι-A. Η μετάλλαξη εντοπίζεται στο εξόνιο 6 κοντά στην διαγραφή της 261G βάσης του O<sup>1</sup> αλληλομόρφου, κοντά με την δεσμευτική περιοχή των PCR-SSP εκκινητών. Πιθανώς, ανάλογα με τη συγκέντρωση του εκκινητή που χρησιμοποιείται σε εμπορικά κιτ για την ABO γονοτύπηση, η μετάλλαξη θα μπορούσε να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα [123].



**Εικόνα 46:** Ανάλυση της αλληλουχίας του ABO εξονίου 6 στο DNA του ασθενούς. Ετεροζυγωτίες παρατηρήθηκαν στη θέση 248A> G (νέα παραλλαγή) και 261G> del (O1 αλληλόμορφο). Η διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει την περιοχή δέσμευσης του προς τα εμπρός PCR-SSP εκκινήτη ειδικό για το O1 (261 del) και το μη O1 αλληλόμορφο (261G).

Με βάση τα αποτελέσματα μας από τον έλεγχο για το αλληλόμορφο Aw34 σε 1.820 γερμανούς αιμοδότες, προτείνουμε ότι το παραλλαγμένο αλληλόμορφο είναι πολύ σπάνιο, αν όχι απλά μια ιδιωτική μετάλλαξη στην οικογένεια του ασθενούς. Εντούτοις, ο χαρακτηρισμός της ομάδας αίματος του ασθενούς ήταν σημαντικό για περαιτέρω μεταγίσεις και διαγνωστικών δεδομένων ως προς την ομάδα αίματος. Παρά την απουσία των ιστοσυγκολλητινών αντι-A, μετάγγιση αίματος ομάδας O συμπτωνωμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων συνιστάται σε αυτές τις περιπτώσεις, γιατί η ανοσοποίηση έναντι A αντιγόνων δεν μπορεί να αποκλειστεί πλήρως. Από την άλλη πλευρά, οι αιμοδότες φορείς τέτοιων ABO παραλλαγών πρέπει να ταξινομούνται ως ομάδα αίματος A μιας και υπολειμματικά αντιγόνα A θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ανοσολογική αντίδραση σε δέκτες με ιστοσυγκολλητινές αντι-A. Εν ολίγοις, η ταυτοποίηση των παραλλαγών του ABO γονιδίου που σχετίζονται με υποομάδες ABO είναι μια σημαντική συμβολή σε κάθε μεμονωμένη περίπτωση και προσθέτει επίσης γνώση για την τρέχουσα κατανόηση των γενετικών παραγόντων που επηρεάζουν τις ομάδες αίματος [123].

#### **4.7 ABO γονοτυπωση, τυπικές κλινικές εφαρμογές και ο ρόλος της σήμερα.**

Σήμερα, τυπικές κλινικές εφαρμογές για την γονοτύπωση της ομάδα αίματος πραγματοποιείται από τις RH, FY και άλλες πρωτεϊνικές βάσεις δεδομένων με βάση τα συστήματα της ομάδας αίματος, αλλά σπάνια για το ABO [124]. Οι μέθοδοι προσδιορισμού της ABO [125] και RH [126] ομάδας με την τεχνική PCR-SSP επέφεραν τα πρώτα εμπορικά αντιδραστήρια (κιτ) προσδιορισμού της ομάδας αίματος [127, 128], τα οποία είναι διαθέσιμα μέχρι σήμερα. Ο προσδιορισμός του ABO συστήματος καλύπτεται από ένα μόνο εκ των δύο εμπορικών πλατφόρμων ειδικών για ανίχνευση του γονότυπου ομάδας αίματος, από ότι φαίνεται συγκρίνοντας το και με μια πρόσφατη περίπτωση [129]. Ο γενετικός προσδιορισμός του ABO δεν έχει μελετηθεί από ένα εργαστήριο ειδικό στην ανάπτυξη μοριακών δοκιμών [130] ούτε από τη μεγαλύτερη δημοσιευμένη μελέτη [131, 132] σε επιλεγμένους δότες, η οποία να βασίζεται στην ίδια τεχνική για τον προσδιορισμό του γονότυπου της ομάδα αίματος [130]. Ένα δεύτερο εργαστήριο που ανέπτυξε μοριακό διαγνωστικό τεστ [133] με αναμφισβήτητα υψηλότερη απόδοση και που είναι διαθέσιμο σήμερα [134], επίσης δεν καλύπτει το προσδιορισμό του ABO συστήματος. Γιατί ο προσδιορισμός του ABO γονότυπου δεν χρησιμοποιείται ευρύτερα στο κλινικό περιβάλλον;

Ο προσδιορισμός της ABO ομάδας αίματος είναι ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα κλινικά τεστ για κάθε φαινότυπο και μεταξύ των λιγότερων ακριβών. Στα περισσότερα νοσοκομεία σε όλο τον κόσμο, το εργαστηριακό προσωπικό μπορεί να εκτελέσει τη δοκιμασία ABO μέσα σε δέκα λεπτά, σε εικοσιτετράωρη βάση, όταν καλύπτουν τραύματα ή άλλα χειρουργεία έκτακτης ανάγκης. Η αρχή των δοκιμών που βασίζονται σε αντίσωμα για ABO παραμένει αμετάβλητη από την αρχική μέθοδο συγκόλλησης σε σωλήνες που έχει αναπτυχθεί πάνω από 10 χρόνια πριν. Είναι ένα από τα πιο αξιόπιστα τεστ για εύρεση κλινικών φαινότυπων με τα ποσοστά σφάλματος σε δότες αίματος τόσο χαμηλά όσο 1 σε 500.000 ή λιγότερο. Έχει γίνει ο προσδιορισμός του γονότυπου του ABO συστήματος θύμα της επιτυχίας της ορολογικής εξέτασής; [135]

#### **4.8 Η επόμενη γενιά αλληλούχηση είναι μια αξιόπιστη στρατηγική για την γονοτύπηση των ομάδων αίματος**

Αν και έχουν σχεδιαστεί πολλά εργαλεία μέσης / υψηλής απόδοσης για μοριακή ανάλυση των γονιδίων των ομάδων αίματος, συνήθως βασίζονται στη στόχευση πολυμορφισμών που προκύπτουν από μεταλλάξεις μονών νουκλεοτιδίων, ενώ άλλες παραλλαγές παραμένουν άγνωστες. Για να παρακάμψουν αυτόν τον περιορισμό μια στρατηγική για την γονοτύπηση των γονιδίων των ομάδων αίματος με την αλληλούχηση επόμενης γενιάς (NGN, next-generation sequencing) συστάθηκε. Βιβλιοθήκες που περιλαμβάνουν εξόνια, flanking ιντρόνια και αμετάφραστες περιοχές 18 γονιδίων που εμπλέκονται σε 15 συστήματα αίματος, παράγονται από την Ion AmpliSeq™ Library kit 2.0 και από τον κατακερματισμό προϊόντων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, κανονικοποιώντας τα αποτελέσματα με δύο διαφορετικές προσεγγίσεις, αναμιγνύοντάς τα και βρίσκοντας την αλληλουχία από τον αναλυτή Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM™). Σε αυτές τις συνθήκες καθορίζουν τα όρια της μεταβλητότητας και των ενδο- και των δια-δειγμάτων, αλληλουχίες από μικτές βιβλιοθήκες διαβάζονται σε ένα ενιαίο τρέξιμο και προκύπτει μια συνολική κάλυψη του 86.03% των κωδικοποιητικών αλληλουχιών DNA, συμπεριλαμβανομένων όλων των γονιδιακών τόπων που καθορίζουν τα πλέον κλινικά σχετικά αντιγόνα σε όλα τα γονίδια, εκτός από αυτά του ABO [136].

Η πρώτη σειρά πειραμάτων υποδεικνύει μερικά από τα τρέχοντα ζητήματα της NGS. Το συγκεκριμένο παράδειγμα του γονιδίου ABO αναδεικνύει ένα τυπικό μειονέκτημα της PGM-βάσης μεθόδου αλληλούχησης. Πράγματι, αρκετά εξόνια και εσώνια αποτελούνται από διαδοχικά τμήματα ομοπολυμερών [35], που είναι γνωστό ότι μειώνουν την αντίδραση πολυμερισμού, στη συνέχεια, ότι μεταβάλλουν την ποιότητα των διαβασμένων, και την αλληλούχηση των ανεπεξέργαστων δεδομένων και τέλος την ευθυγράμμιση των αλληλουχιών με βάση υπολογιστικό πρόγραμμα [137]. Ένα άλλο μειονέκτημα του συστήματος είναι οι χαρακτηριστικά πλούσιες περιοχές σε GC στο 5' UTR και στο εξώνιο 1 που απαιτούν όχι συνηθισμένες συνθήκες για την ενίσχυσή τους (προσωπικά δεδομένα). Μολονότι το 100% των CDS θεωρήθηκε ότι καλύπτονται από τα ενισχυμένα τμήματα, δεν υπάρχουν πρακτικά δεδομένα που θα μπορούσαν να ληφθούν για το γονίδιο αυτό. Στη συγκεκριμένη περίπτωση αυτού του γονιδίου, το όριο στην πραγματικότητα δεν είναι η κατασκευή

της βιβλιοθήκης, αλλά η δομή του γονιδίου (δηλαδή, πλούσιες σε GC αλληλουχίες, ομοπολυμερή) αυτό άμεσα είτε μειώνει την PCR ενίσχυση ή την ευθυγράμμιση της αλληλουχίας. Αν το ABO αποκλειστεί από το σχέδιο, η πειραματική CDS κάλυψη στην πραγματικότητα αυξήθηκε, μέχρι 89.40% έναντι του 86.03%. Αυτό υποδηλώνει ότι η δοκιμή μας δεν είναι επαρκής για την αλληλούχηση του ABO γονιδίου. Το κατά πόσο αυτό το γονίδιο μπορεί να παράγει υψηλής ποιότητας στοιχεία με εναλλακτικά συστήματα NGS μένει να καθοριστεί [136].

Είναι σημαντικό να τονίσουμε, ότι η προκλητική προσπάθεια να δημιουργηθούν ειδικά γονιδιακά δεδομένα για τα ομόλογα γονίδια ήταν επιτυχής. Αυτό το έργο, το οποίο συνδυάζει δύο συμπληρωματικές προσεγγίσεις για την δημιουργία βιβλιοθηκών, καθορίζει τις τεχνικές προϋποθέσεις για την γονοτύπηση των γονιδίων των ομάδων αίματος, υποδεικνύει ότι η NGS είναι κατάλληλη για μια τέτοια εφαρμογή και προτείνει ότι, μετά την αυτοματοποίηση της μεθόδου, αυτό το νέο εργαλείο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον μοριακό προσδιορισμό σε επίπεδο εργαστηρίου [136].

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ**

Ύστερα από την ανακάλυψη του συστήματος ABO, από τον Karl Landsteiner το 1901, ο Felix Bernstein το 1924 προέβλεψε ότι ο μηχανισμός κληρονομικότητάς του περιλαμβάνει 3 αλληλόμορφα που εδράζονται στο μακρό σκέλος του χρωμοσώματος 9, θέση 9q34.1. Δεν κωδικοποιούν για A και B αντιγόνα, αλλά για ένζυμα τρανσφεράσες που καταλύουν την προσθήκη μονοσακχαριτών σε ολιγοσακχαριδικές αλυσίδες. Οι υποομάδες των ABO διακρίνονται από μειωμένες ποσότητες των A, B ή O (H) αντιγόνων στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων. Οι υποομάδες A ταξινομούνται με βάση την ποσότητα των A αντιγόνων, και η ποσότητα του A αντιγόνου μειώνεται με τη σειρά  $A_1, A_2, A_3, A_x, A_m, A_{el}$ . Παρόμοια, οι υποομάδες της ομάδας αίματος B ταξινομούνται με βάση την ποσότητα του B αντιγόνου, που μειώνεται με τη σειρά  $B, B_3, B_x, B_m, B_{el}$ . Η ομάδα αίματος AB ταξινομείται σε εννιά υποομάδες ( $A^x B, A^1 B^x, A^m B, A^1 B^m, A^{el} B, A^1 B^{el}, cis A^2 B^3, cis A^2 B, cis A^1 B^3$ ) με βάση την ποσότητα των A και B αντιγόνων. Ιδίως η cisAB υποομάδα, είναι ένας πολύ σπάνιος φαινότυπος και έχει τρεις τύπους αίματος,  $cis A^2 B^3 (A^2 B^3/O), cis A^2 B (A^2 B^3/B), cis A^1 B^3 (A^2 B^3/A^1)$ .

Οι Yamamoto, et al. κλωνοποίησαν και καθόρισαν τις δομές τους. Έκαναν γενετική ανάλυση των αντιγόνων του ABO συστήματος χρησιμοποιώντας τεχνικές μοριακής βιολογίας. Γονοτυπικά το  $O_1$  αλληλόμορφο διαφέρει από το  $A_1$  αλληλόμορφο κατά μία έλλειψη νουκλεοτιδικής βάσεις στη θέση 261. Αυτή η έλλειψη οδηγεί την αλληλουχία εκτός πλαισίου ανάγνωσης, δημιουργώντας ένα πρώιμο κωδικόνιο λήξης στη νουκλεοτιδική θέση 352±354 (Yamamoto et al, 1990a). Το  $O_1$  θεωρείται είτε ότι είναι σιωπηλό αλληλόμορφο ή ότι μεταφράζεται σε ένα ενζυματικά ανενεργό αμινοξικό πεπτίδιο που του λείπει η λειτουργική περιοχή της γλυκοσυλτρανσφεράσης (Yamamoto et al, 1990a). Δύο νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις διαχωρίζουν το  $A_1$  από το  $A_2$  αλληλόμορφο: 467 (C→T. Pro-Leu) και 1059 (C→ -, αλλαγή πλαισίου ανάγνωσης). Η έλλειψη βάσης στη θέση 1059 προκαλεί ένα νέο πλαίσιο ανάγνωσης που έχει ως αποτέλεσμα την προσθήκη 21 αμινοξικών καταλοίπων στο καρβοξυτελικό άκρο της τρανσφεράσης (Yamamoto et al, 1992). Το  $A_1$  με το  $O_2$  αλληλόμορφο διαφέρουν μεταξύ τους σε 3 βάσεις, 2 από τις οποίες οδηγούν σε αντικατάσταση αμινοξέως: 297 (A→G, σιωπηλή), 526 (C→G, Arg→Gly) και 802 (G→A, Arg→Gly) (Yamamoto et al, 1993d). Οι νουκλεοτιδικές

αντικαταστάσεις στις θέσεις 297 και 526 παρατηρούνται επίσης και στο B αλληλόμορφο, αφήνοντας τη θέση 802 ως την κύρια νουκλεοτιδική αντικατάσταση υπεύθυνη για τη μη λειτουργικότητα της κωδικοποιούμενης γλυκοσυλτρανσφεράσης. Επιπλέον μετά από γενετική ανάλυση προκύπτει ότι τα A<sup>el</sup> άτομα διαθέτουν ένα αλληλόμορφο με IVS6 + 5G-A μετάλλαξη (Transfusion 2003;43:1138-1144) και B<sup>el</sup> άτομα να διαθέτουν ένα γονίδιο B με 502C-T μετάλλαξη στην Ταϊβάν (Vox Sanguinis 2003; 85: 216-220). Τέλος οι Yamamoto et al<sup>2</sup> ήταν οι πρώτοι που ανέφεραν ότι υπάρχουν επτά 7 νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις μεταξύ του A<sup>1</sup> και B αλληλομόρφου: 297 (A-G, σιωπηλή), 526 (C-G, Arg-Gly), 657 (C-T, σιωπηλή), 703 (G-A, Gly-Ser), 796 (C-A, Leu-Met), 803 (G-C, Gly-Ala) και 930 (G-A, σιωπηλή) (Yamamoto et al,1990a) και έχουν ως αποτέλεσμα τέσσερις διαφορές στην αλληλουχία των αμινοξέων, στις θέσεις 176, 235, 266, και 268. Έδειξαν ότι τα τελευταία δύο αμινοξικά κατάλοιπα στις θέσεις 266 και 268 είναι σημαντικά για την A/B τρανσφεράση με ειδικότητα σακχάρου στην ανοικοδόμηση του γονιδίου και σε μελέτες έκφρασής του. Ένα αλληλόμορφο που κωδικοποιεί μια διλειτουργική τρανσφεράση με ειδικότητα σακχάρου. Οι νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις στις θέσεις 703, 796, και 803 είναι κρίσιμες στο καθορισμό της ειδικότητας της γλυκοσυλτρανσφεράσης (Yamamoto & Hakomori,1990).

Λόγω του γεγονότος ότι ο προσδιορισμός των υποομάδων του ABO συστήματος με συμβατικές ορολογικές μεθόδους είναι χρονοβόρος, καλύπτει ορισμένες μόνο κατηγορίες αντιγόνων όπως A<sup>2</sup>, A<sup>el</sup> και μερικές φορές δίνει ψευδώς θετικά και ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, είναι αναγκαίο να αναπτυχθούν πρόσθετες μοριακές τεχνικές για τον προσδιορισμό περισσότερων αντιγόνων που ανήκουν στις υποομάδες του ABO συστήματος.

Οι μοριακές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τη γονοτύπηση των ABO ομάδων αίματος έχουν βασιστεί στην βασική μέθοδο της PCR και έχουν γίνει πιο εξειδικευμένες και ευαίσθητες ώστε να μπορέσουμε να ανιχνεύσουμε όλα τα υπάρχοντα αλληλόμορφα. Χρησιμοποιήθηκαν και αναλύθηκαν οι εξείς μέθοδοι: η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης-περιορισμένου μήκους θραύσματος πολυμορφισμού (PCR-RFLP, restriction fragment length polymorphism), η PCR-άμεσης αλληλούχισης(PCR-direct sequencing), η PCR- διαμόρφωση μονόκλωνου πολυμορφισμού (PCR-SSCP, single strand conformation polymorphism), η PCR-ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλομόρφων (PASA, PCR-amplification of specific

alleles) ή ASPCR και πραγματικού χρόνου PCR μέσω ανάλυσης των καμπύλων τήξεως (real time PCR, melting curve analysis)

Συγκρίνοντας τις μεθόδους καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα. Οι μέθοδοι PCR-RFLP, PCR-direct sequencing και PCR-SSCP απαιτούν διαδικασίες δύο σταδίων, και επιπλέον δεν είναι εύκολες να χρησιμοποιηθούν σε κλινικά εργαστήρια. Η PASA μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι η PCR ενίσχυση συμβαίνει μόνο όταν το 3' άκρο του εκκινήτη αντιστοιχείται με το νουκλεοτίδιο στο οποίο έχει γίνει η μετάλλαξη. Η PASA μέθοδος απαιτεί μόνο περίπου 4 ώρες από την έναρξη της PCR έως το τέλος της ανάλυσης. Ως εκ τούτου, η μέθοδος PASA είναι ταχεία, απλή και χρήσιμη για την ανίχνευση του γονότυπου των ABO και cisAB ομάδων αίματος σε σύγκριση με τις μεθόδους PCR-RFLP, PCR-direct sequencing και PCR-SSCP και χρησιμοποιείται ευρέως σε όλη την έρευνα και τα κλινικά εργαστήρια.

Εκτός όμως από τις μεθόδους που αναφέραμε και που βασίζονται στην PCR, συμπεριλαμβανομένων των multiplex SSP, RFLP, και SSCP, PASA, έχει αναφερθεί για τον προσδιορισμό του γονότυπου των ABO ομάδων αίματος η τεχνική real-time PCR και ιδιαίτερα για τον προσδιορισμό στο αίμα των πιθανών  $A^{el}$  και  $B^{el}$  αλληλομόρφων. Αυτή η μέθοδος έχει αρκετά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τις ορολογικές αλλά και τις άλλες μοριακές μεθόδους. Η τεχνική real-time PCR είναι ακριβέστερη και σαφώς αποκαλύπτεται αυτό από την ανάλυση του προφίλ της καμπύλης τήξης. Σε αντίθεση, η ορολογική μέθοδος προσδιορισμού της ομάδας αίματος συνήθως εξαρτάται από την αντικειμενική παρατήρηση των συγκολλημένων ερυθρών (RBC) και μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένη ανάγνωση της ομάδας αίματος. Η real-time PCR έχει καλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα συνήθως <1 ml περιφερικού αίματος απαιτείται για τη τεχνική αυτή. Μιας και ο προσδιορισμός των ομάδων αίματος  $A^{el}$  και  $B^{el}$  επιτυγχάνεται εντός 90 λεπτών μετά την εκχύλιση του DNA, και έτσι αποτελεί επίσης μια γρήγορη μέθοδο.

Βέβαια, η πολλαπλή ABO γονοτύπηση που περιγράφεται στη συνέχεια, χρησιμοποιεί ένα γρήγορο PCR όργανο και μία βελτιστοποιημένη πολυμεράση, καθιστώντας δυνατό τον άμεσο χαρακτηρισμό του αίματος, των τριχών, και των δειγμάτων σιέλου χωρίς προηγούμενη απομόνωση DNA σε περίπου 70 λεπτά. Μόλις 1 μl του αίματος, μία ρίζα της τρίχας, ή λεκές από αίμα 1,2-mm-διαμέτρου ή λεκές από σάλιο είναι επαρκής για τον ακριβή προσδιορισμό του γονότυπου ABO με καλές αναλογίες ύψος κορυφής ετεροζυγωτών και χωρίς να συμβαίνει εγκατάλειψη καμίας θέσης.

Ως εκ τούτου, προτείνουμε ένα νέο διάγραμμα ροής εργασιών για τον προσδιορισμό σπάνιων ομάδων αίματος. Πρώτον, μία ορολογική μέθοδος που θα χρησιμοποιείται για την ταχεία διαλογή ως προς την παρουσία του αντιγόνου και του αντισώματος ABO. Όταν ληφθεί ένα αποτέλεσμα όπου ο προσδιορισμός της ευθείας ομάδα αίματος είναι O και η ανάστροφη ομάδα αίματος δίνει A ή B, απομονώνουμε γονιδιωματικό DNA από το περιφερικό αίμα για να εφαρμόσουμε μία από τις τεχνικές PCR, κατά προτίμηση την PASA ή την real time PCR όπως προκύπτει από τη σύγκριση των μεθόδων, για να προσδιορίσουμε σε ποια υποομάδα του ABO αίματος ανήκει το υπό δοκιμή υποκείμενο.

Η ανάγκη προσδιορισμού των υποομάδων στο πληθυσμό έγκειται στο γεγονός ότι τα διαφορετικά αλληλόμορφα προκαλούν ποσοτικές και κάποια άλλα ποιοτικές διαφορές στην παραγόμενη τρανσφεράση και η γνώση αυτή θα μας βοηθούσε στην επιλογή του πιο κατάλληλου αίματος προς μετάγγιση. Όσον αφορά τα αλληλόμορφα που επηρεάζουν την ποσότητα των A και B αντιγόνων στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων, ταξινομούνται με βάση την εξής ποσοτική σειρά  $A^1 > A^2 > A^3 > A^x > A^{el}$  ή  $B > B^3 > B^x > B^{el}$ , είναι αναμενόμενο ότι τα πιο σημαντικά αμινοξέα για τα επίπεδα της ενζυματικής δραστηριότητας βρίσκονται στις θέσεις 214 (Met ή Arg), 216 (Phe ή Ile) και 223 (Glu ή Asp). Η αντικατάσταση των αμινοξέων στις θέσεις 291 (Asp σε Asn) και 352 (Arg σε Gly/Trp) μπορεί επίσης να οδηγήσουν σε μείωση των επιπέδων δραστηριότητας, αλλά το αμινοξύ που αλλάζει στην θέση 156 (Pro σε Leu) και 277 (Val σε Met) μπορεί να έχει μικρή επίδραση.

Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι βρήκαν μία προσθήκη νουκλεοτιδίου (G) στη περιοχή 798-804 που περιέχει επαναλήψεις γουανίνης, σε ένα από τα αλληλόμορφα που λαμβάνονται από τα δείγματα με  $A^{el}$  φαινότυπο. Αυτή η αλλαγή έχει ως αποτέλεσμα αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης που οδηγεί σε μια διαφορετική αμινοξική αλληλουχία και τη δημιουργία ενός κωδικονίου λήξης σε διαφορετική θέση. Αυτή η αλλαγή οδηγεί σε μεγαλύτερη μείωση του επιπέδου της ενζυματικής δραστηριότητας από εκείνη του  $A^2$  αλληλομόρφου που έχει μια νουκλεοτιδική έλλειψη μεταξύ των θέσεων 1059 και 1061. Αυτά τα αποτελέσματα ξεκάθαρα υποδεικνύουν ότι πολλαπλά αλληλόμορφα θα μπορούσαν να προκαλέσουν ένα συγκεκριμένο ABO φαινότυπο και ότι οι συχνότητές τους ποικίλουν μεταξύ διαφόρων πληθυσμών.

Μια νέα παραλλαγή του ABO γονιδίου η Aw34 που σχετίζεται με πολύ αδύναμη έκφραση του αντιγόνου A και την απουσία ισοσυγκολλητινών αντι-A, μας

υποδεικνύει την αναγκαιότητα προσδιορισμού όλων των αλληλομόρφων του ABO γονιδίου που σχετίζονται με υποομάδες. Η μετάλλαξη εντοπίζεται στο εξώνιο 6 κοντά στην διαγραφή της 261G βάσης του O<sup>1</sup> αλληλομόρφου. Από την άλλη πλευρά, οι αιμοδοτές φορείς τέτοιων ABO παραλλαγών πρέπει να ταξινομούνται ως ομάδα αίματος A μιας και υπολειμματικά αντιγόνα A θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ανοσολογική αντίδραση σε δέκτες με ιστοσυγκολλητινές αντι-A. Εν ολίγοις, η ταυτοποίηση των παραλλαγών του ABO γονιδίου που σχετίζονται με υποομάδες ABO είναι μια σημαντική συμβολή σε κάθε μεμονωμένη περίπτωση και προσθέτει επίσης γνώση για την τρέχουσα κατανόηση των γενετικών παραγόντων που επηρεάζουν τις ομάδες αίματος.

Όσον αφορά την εξελικτική προέλευση των αλληλομόρφων του ABO συστήματος είναι ξεκάθαρο ότι υπάρχουν δύο διακριτές εξελικτικές γραμμές οι \*A και \*B. Τα αποτελέσματα τελικώς υποδεικνύουν ότι διαφορετικά αλληλόμορφα είναι υπεύθυνα για τους ίδιους ABO ποικίλους φαινότυπους, και ότι η εξελικτική τους γραμμή δεν είναι απαραίτητα η ίδια.

Στη συνέχεια της εργασίας παρουσιάσαμε τις ορολογικές μεθόδους προσδιορισμού της ABO ομάδας αίματος όπως είναι πρώτον ο προσδιορισμός πάνω στην πλάκα εργασίας των ερυθροκυτταρικών αντιγόνων A και B (ευθεία) και ο προσδιορισμός των αντισωμάτων αντι-A και αντι-B που υπάρχουν στον ορό του ασθενούς (ανάστροφη). Δεύτερον ο προσδιορισμός της ομάδας αίματος της ευθύς και της ανάστροφης αντίδρασης σε σωληνάρια (*in vitro*) μιμούμενοι τις φυσιολογικές συνθήκες και πραγματοποιώντας της στο εργαστήριο (σε σωληνάριο). Τρίτον ο προσδιορισμός των αντιγόνων A, B και D με την μέθοδο μικροσωληναρίων γέλης, μία μέθοδος με αυξημένη ευαισθησία που αποτελείται από μικροσωληνάρια τα οποία περιέχουν γέλη με εμποτισμένους αντιορούς (π.χ. αντι-A, αντι-B, αντι-AB και αντι-D ή και άλλους).

Ο προσδιορισμός της ομάδας αίματος με βάση το DNA αποτελεί μια πολύτιμη συμπληρωματική και όχι εναλλακτική λύση στις παραδοσιακές μεθόδους προμεταγγισιακού ελέγχου. Οι παραδοσιακές μέθοδοι προσδιορισμού της ABO και D ομάδας είναι πιθανό να συνεχιστούν, και οι μέθοδοι για ανίχνευση και αναγνώριση αντισωμάτων στον ορό του ασθενούς θα εξακολουθούν να είναι υποχρεωτικές. Θεωρητικά, είναι δυνατό να ταιριάζουμε τους γονότυπους της ομάδας αίματος του ασθενή με του δότη ηλεκτρονικά με τη χρήση της τεχνολογίας του τσιπ γονιδίου. Ωστόσο, αυτό προϋποθέτει η μέθοδος με βάση το DNA να είναι εντελώς ισχυρή, η

οποία όμως δεν είναι επειδή νέες μεταλλάξεις προκύπτουν συνεχώς. Προϋποθέτει επίσης να υπάρχει διαθέσιμο αίμα προς μετάγγιση σε κάθε δεδομένη στιγμή και να ταιριάζει με τους φαινότυπους της ομάδας αίματος όλων των ασθενών για όλα τα δυνατόν πολυμορφικά αντιγόνα που είναι κλινικά σημαντικά, κατάσταση η οποία είναι μη ρεαλιστική. Ωστόσο η Tandem εφαρμογή, της βασιζόμενης στο DNA μεθοδολογίας και οι υφιστάμενες μέθοδοι θα παρέχουν σε μεγάλο βαθμό βελτιώσεις στην παροχή προσδιορισμένου ως προς την ομάδα αίματος και τον φαινότυπο αίματος, σε ασθενείς με αλλοαντισώματα.

Για να παρακάμψουμε βέβαια αυτόν τον περιορισμό περιγράψαμε την μέθοδο αλληλούχησης επόμενης γενιάς (NGS, next-generation sequencing) για την γονοτύπηση των γονιδίων των ομάδων αίματος. Το κύριο πλεονέκτημα του συστήματος NGS είναι ότι παρέχει μια σφαιρική άποψη της ποικιλίας των αλληλόμορφων που υπάρχουν σε πολλαπλά γονίδια χωρίς να έχει σημασία η εθνικότητα ή οι πολυμορφισμοί, ενώ άλλα εργαλεία υψηλής απόδοσης στοχεύουν μόνο σε αρκετά SNP την ίδια στιγμή. Το αμέσως επόμενο βήμα είναι να επιβεβαιώσουμε την ισχύ και την ευρωστία της προσέγγισής μας σε αρκετές δεκάδες άτομα διαφόρων εθνοτικών προελεύσεων σε μια συγκριτική μελέτη. Εν ολίγοις έχουμε καθορίσει τις προϋποθέσεις και τα πλεονεκτήματα, καθώς και τις μελλοντικές κατευθύνσεις για την εφαρμογή μιας ρουτίνας για την γονοτύπηση των ομάδων αίματος σε πολλά γονίδια με μείζονα δομική ποικιλία από την NGS βάση δεδομένων, σε εργαστηριακό επίπεδο, η οποία είναι πιθανό να είναι το επόμενο βήμα σε αυτό το πεδίο στο εγγύς μέλλον (Tilley & Grimsley, 2014).

Εξελικτικά λοιπόν ξεκινήσαμε από τις συμβατικές τεχνικές PCR, στις PCR πραγματικού χρόνου, και στα συστήματα digital PCR και chip πραγματικού χρόνου. Σύντομα αναμένεται σε επίπεδο διάγνωσης και η αλληλούχηση επόμενης γενιάς η οποία πιθανότητα να αντικαταστήσει την Real Time PCR.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΩΝ

**Πίνακας 13:** Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων.

---

| Ξενόγλωσσος όρος          | Ελληνικός όρος                  |
|---------------------------|---------------------------------|
| Antigen                   | Αντιγόνο                        |
| Allele                    | Αλληλόμορφο                     |
| Primer                    | Εκκινητής                       |
| Galactose                 | D-Γαλακτόζη                     |
| Fucose                    | L-Φουκόζη                       |
| N-Acetylgalactosamine     | N-Ακέτυλογαλακτοζαμίνη          |
| N-Acetylglucosamine       | N-Ακέτυλογλυκοζαμίνη            |
| Polymerase chain reaction | Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης |
| Gel                       | Πήκτωμα                         |
| Single pass               | Μονή δίοδος                     |
| Multi pass                | Πολλαπλή δίοδος                 |
| Deoxyribonucleic acid     | Δεόξυριβονουκλεϊκό οξύ          |

---

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΟΝΥΜΑ

|                 |                                                           |
|-----------------|-----------------------------------------------------------|
| <b>Gal D</b>    | D-Γαλακτόζη                                               |
| <b>Fuc</b>      | L-Φουκόζη                                                 |
| <b>GalNAc</b>   | N-Ακέτυλογαλακτοζαμίνη                                    |
| <b>GluNAc</b>   | N-Ακέτυλογλυκοζαμίνη                                      |
| <b>PCR</b>      | Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης                           |
| <b>PCR-RFLP</b> | PCR-περιορισμένου μήκους θραύσματος                       |
| <b>PCR-SSCP</b> | PCR- διαμόρφωση μονόκλωνου πολυμορφισμού                  |
| <b>PASA</b>     | PCR- ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλομόρφων                  |
| <b>ASPCR</b>    | Ειδική για το αλληλόμορφο αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης |
| <b>SNPs</b>     | Πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου                          |
| <b>DNA</b>      | Δεόξυριβονουκλεικό οξύ                                    |
| <b>EQA</b>      | Εξωτερική αξιολόγηση ποιότητας                            |
| <b>HDFN</b>     | Αιμολυτική νόσος του νεογνού                              |
| <b>NGN</b>      | Επόμενης Γενιάς Αλληλούχηση                               |
| <b>EDTA</b>     | Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ                             |

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. ΙΑΣΠΙΣ. *Ιστορία της Αιμοδοσίας*. Available from: <http://panacea.med.uoa.gr/topic.aspx?id=124>.
2. Πιστοφίδης, Α. *Οι Μεταγγίσεις νέου αίματος αναστρέφουν τη γήρανση Όχι όμως το θάνατο και τη βαρβαρότητα*. Σάββατο, 20 Οκτωβρίου 2012; Available from: [http://kafeneio-gr.blogspot.gr/2012/10/o\\_20.html#.VO5HF\\_msXHQ](http://kafeneio-gr.blogspot.gr/2012/10/o_20.html#.VO5HF_msXHQ).
3. *Μετάγγιση αίματος, Ιστορική εξέλιξη*. Available from: [http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9C%CE%B5%CF%84%CE%AC%CE%B3%CE%B3%CE%B9%CF%83%CE%B7\\_%CE%B1%CE%AF%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%BF%CF%82](http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9C%CE%B5%CF%84%CE%AC%CE%B3%CE%B3%CE%B9%CF%83%CE%B7_%CE%B1%CE%AF%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%BF%CF%82).
4. *Circulatory system*. 22 February 2015; Available from: [http://en.wikipedia.org/wiki/Circulatory\\_system](http://en.wikipedia.org/wiki/Circulatory_system).
5. Πέτρος, Κ.Γ.κ.Σ. *η ιστορία των μεταγγίσεων πριν την ανακάλυψη των ομάδων αίματος*. Jan 12 2014, .
6. *Μετάγγιση: από την Ιστορία της*. Τετάρτη, 1 Οκτωβρίου 2014; Available from: <http://timolewn.blogspot.gr/>.
7. *Blundell's blood transfusion apparatus, London, England, 1801-1900* Available from: <http://www.sciencemuseum.org.uk/broughttolife/objects/display.aspx?id=91993>.
8. *Blood group terminology 1990. The ISBT Working Party on Terminology for Red Cell Surface Antigens*. Vox Sang, 1990. **58**(2): p. 152-69.
9. Daniels, G.L., et al., *Blood group terminology 2004: from the International Society of Blood Transfusion committee on terminology for red cell surface antigens*. Vox Sang, 2004. **87**(4): p. 304-16.
10. Karl, L., *Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und der Lymphe*. Zentralbl Bakteriöl 1900. **27**: p. 357-362.
11. *Karl Landsteiner*. 2014, Soylen Communications: NNDB.
12. Hosoi, E., *Biological and clinical aspects of ABO blood group system*. J Med Invest, 2008. **55**(3-4): p. 174-82.
13. von Decastello A, S.A., *Ueber die Isoagglutinine in Serum gesunder and Kranker Menschen* Mfinch med Wschr, 1902. **49**: p. 1090-1095.
14. Andersson, M., et al., *Structural studies of the O-antigenic polysaccharide of Escherichia coli O86, which possesses blood-group B activity*. Carbohydr Res, 1989. **185**(2): p. 211-23.
15. Reid ME, L.-F.C., *The blood group antigen: Facts Book*,. 1997, New York: Academic Press,.
16. Γερανιωτάκη Φωτεινή, Μ.Γ., Σοφούλης Νικόλαος, *αιματολογία αιμοδοσία II. Ειδικότητα Βοηθών Ιατρικών και Βιολογικών Εργαστηρίων*, ed. ο. κύκλος. 2001, Τομέας Υγείας και Πρόνοιας, Παιδαγωγικό Ινστιτούτο: Ματίνα Στάππα. 7.

17. WM., W. and *Molecular basis of antigenic specificity in the ABO, H and Lewis blood group systems* ; Montreuil H, Vliegenhart JFG, Schachter H(eds) *Glycoproteins*. . 1995, Elsevier: Amsterdam,. p. 313- 390.
18. Zmijewski, C.M., *Immunohematology*. 1978, New York; London: Appleton-Century-Crofts ; Prentice-Hall.
19. Richard A. Goldsby, T.J.K., Janis Kuby, Barbara A. Osborne, *Immunology*. 2003, W. H. Freeman; 5th edition: New York.
20. Oriol, R., *GENETIC CONTROL OF THE FUCOSYLATION OF ABH PRECURSOR CHAINS. EVIDENCE FOR NEW EPISTATIC INTERACTIONS IN DIFFERENT CELLS AND TISSUES*. *International Journal of Immunogenetics*, 1990. **17**(4-5): p. 235-245.
21. Watkins, W.M., *Biochemistry and Genetics of the ABO, Lewis, and P blood group systems*. *Adv Hum Genet*, 1980. **10**: p. 1-136, 379-85.
22. Hakomori, S., *Philip Levine award lecture: blood group glycolipid antigens and their modifications as human cancer antigens*. *Am J Clin Pathol*, 1984. **82**(6): p. 635-48.
23. Schachter, H., et al., *Qualitative Differences in the N-Acetyl-D-galactosaminyltransferases Produced by Human A(1) and A(2) Genes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1973. **70**(1): p. 220-224.
24. Poretz, R.D. and W.M. Watkins, *Galactosyltransferases in Human Submaxillary Glands and Stomach Mucosa Associated with the Biosynthesis of Blood Group B Specific Glycoproteins*. *European Journal of Biochemistry*, 1972. **25**(3): p. 455-462.
25. Yamamoto, F., P.D. McNeill, and S. Hakomori, *Genomic organization of human histo-blood group ABO genes*. *Glycobiology*, 1995. **5**(1): p. 51-8.
26. Manual, A.T., *Blood Types and the Population*, in *Blood Centers of the Pacific*. 2015.
27. *Απο πλευράς αίματος, χωρίζομαστε σε 4 βασικές ομάδες.*; Available from: <https://kosmaseer.wordpress.com/2011/10/28/%CE%B1%CE%B9%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%BF%CE%BB%CE%BF%CE%B3%CE%B9%CE%BA%CE%B5%CF%83-%CE%B5%CE%BE%CE%B5%CF%84%CE%B1%CF%83%CE%B5%CE%B9%CF%83%CF%83%CF%85%CE%BD%CE%BF%CF%88%CE%B7/>.
28. Transfusion, I.S.o.B. *Ανθρώπινα αντιγονικά συστήματα των ομάδων αίματος*. Available from: <http://www.genenames.org/>.
29. Manual, A.T., *Rare Traits*, in *Blood Centers of the Pacific*. 2015.
30. F, B., *Ergebnisse einer biostatistischen zusammenfassenden Betrachtung, ber die erblichen Blutstrukturen des Menschen*. Vol. 3. 1924: Klin Wochenschr
31. Larsen, R.D., et al., *Molecular cloning, sequence, and expression of a human GDP-L-fucose:beta-D-galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase cDNA that can form the H blood group antigen*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(17): p. 6674-8.
32. Yamamoto, F. and S. Hakomori, *Sugar-nucleotide donor specificity of histo-blood group A and B transferases is based on amino acid substitutions*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(31): p. 19257-62.
33. Bennett, E.P., et al., *Genomic cloning of the human histo-blood group ABO locus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995. **206**(1): p. 318-25.

34. Ferguson-Smith, M.A., et al., *Localisation of the human ABO: Np-1: AK-1 linkage group by regional assignment of AK-1 to 9q34*. Hum Genet, 1976. **34**(1): p. 35-43.
35. Yamamoto, F., et al., *Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system*. Nature, 1990. **345**(6272): p. 229-33.
36. Hosoi, E. and K. Yoshikawa, *[Genetic analyses of the genotypes of ABO and cisAB blood groups]*. Rinsho Byori, 1993. **41**(10): p. 1133-40.
37. Hosoi, E., *[Direct determination of ABO and cisAB blood group genotypes using polymerase chain reaction amplification of specific alleles (PASA)--method]*. Rinsho Byori, 1996. **44**(8): p. 783-90.
38. Hosoi, E., *[Genetic analyses of the ABO blood groups and application of the clinical laboratories]*. Rinsho Byori, 1997. **45**(2): p. 148-56.
39. Hosoi, E., et al., *Detection of histo-blood group ABO mRNA in human chronic myeloid leukemia cell lines using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)*. Cancer Lett, 1998. **133**(2): p. 191-6.
40. Ogasawara, K., et al., *Molecular genetic analysis of variant phenotypes of the ABO blood group system*. Blood, 1996. **88**(7): p. 2732-7.
41. Ogasawara, K., et al., *Different alleles cause an imbalance in A2 and A2B phenotypes of the ABO blood group*. Vox Sang, 1998. **74**(4): p. 242-7.
42. Reid, M.E., K. McManus, and T. Zelinski, *Chromosome location of genes encoding human blood groups*. Transfus Med Rev, 1998. **12**(3): p. 151-61.
43. Sturgeon, P., B.P. Moore, and W. Weiner, *NOTATIONS FOR TWO WEAK A VARIANTS: AEND AND AEL*. Vox Sang, 1964. **9**: p. 214-5.
44. Reed, T.E. and B.P. Moore, *A NEW VARIANT OF BLOOD GROUP A*. Vox Sang, 1964. **9**: p. 363-6.
45. Bird, G.W., *Relationship of the blood sub-groups A1, A2 and A1B, A2B to haemagglutinins present in the seeds of Dolichos biflorus*. Nature, 1952. **170**(4329): p. 674.
46. Yamamoto, F., P.D. McNeill, and S. Hakomori, *Human histo-blood group A2 transferase coded by A2 allele, one of the A subtypes, is characterized by a single base deletion in the coding sequence, which results in an additional domain at the carboxyl terminal*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **187**(1): p. 366-74.
47. Economidou, J., N.C. Hughes-Jones, and B. Gardner, *Quantitative measurements concerning A and B antigen sites*. Vox Sang, 1967. **12**(5): p. 321-8.
48. Cartron, J.P., et al., *'Weak A' phenotypes. Relationship between red cell agglutinability and antigen site density*. Immunology, 1974. **27**(4): p. 723-7.
49. Seyfried, H., I. Walewska, and B. Werblinska, *UNUSUAL INHERITANCE OF ABO GROUP IN A FAMILY WITH WEAK B ANTIGENS*. Vox Sang, 1964. **9**: p. 268-77.
50. Yamaguchi H, O.Y., Hazama F *Another Japanese A2B3 blood-group family with the propositus having O-group father*. Vol. 42. 1966: Proc Jpn Acad
51. Okubo Y, T.T., Seno T, Yokoishi F, Fukui M, Bando K *Serological findings and distribution in Tokushima Prefecture of Cis AB*. . Jap J Med Technol, 1979. **28**(66).
52. H., Y., *A review on ABO variants and rare bloods*. . Jap J Med Technol 1985. **43**(1): p. 3-10.
53. Yamamoto, F., et al., *Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 2. cis-AB alleles*. Vox Sang, 1993. **64**(2): p. 120-3.

54. Oriol R., C.J.P., and Rouger P., *In molecular basis of human blood group antigens.*, in *Plenum Press*. 1995: New York. p. 37-73.
55. Lowe J.B, C.J.P., and Rouger P., *In molecular basis of human blood group antigens*, in *Plenum Press*. 1995: New York. p. 75-115.
56. *Polymerase chain reaction*. 27 January 2015; Available from: [http://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase\\_chain\\_reaction](http://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction).
57. Ρένα Λεκανίδου, Σ.Τ., Γεώργιος Κ.Ροδάκης, *Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία*. 2007, Αθήνα: ΓΕΩΡΓΙΟΣ Κ.ΡΟΔΑΚΗΣ.
58. Narayanan, S., *Applications of restriction fragment length polymorphism*. Ann Clin Lab Sci, 1991. **21**(4): p. 291-6.
59. Orita, M., et al., *Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction*. Genomics, 1989. **5**(4): p. 874-9.
60. Hayashi, K. and D.W. Yandell, *How sensitive is PCR-SSCP?* Hum Mutat, 1993. **2**(5): p. 338-46.
61. Makeyev, E.V. and D.H. Bamford, *Primer-independent RNA sequencing with bacteriophage phi6 RNA polymerase and chain terminators*. Rna, 2001. **7**(5): p. 774-81.
62. Μπούτου, Ε., *Εισαγωγή στην PCR πραγματικού χρόνου*, in *European Territorial Cooperation Programme*. Biomed CBC: Greece-Bulgaria.
63. Pearson, S.L. and M.J. Hessner, *A(1,2)BO(1,2) genotyping by multiplexed allele-specific PCR*. Br J Haematol, 1998. **100**(1): p. 229-34.
64. Ugozzoli, L. and R.B. Wallace, *Application of an allele-specific polymerase chain reaction to the direct determination of ABO blood group genotypes*. Genomics, 1992. **12**(4): p. 670-4.
65. Stroncek, D.F., et al., *Determination of ABO glycosyltransferase genotypes by use of polymerase chain reaction and restriction enzymes*. Transfusion, 1995. **35**(3): p. 231-40.
66. Olsson, M.L. and M.A. Chester, *Frequent occurrence of a variant O1 gene at the blood group ABO locus*. Vox Sang, 1996. **70**(1): p. 26-30.
67. Lee, H.Y., et al., *Rapid direct PCR for ABO blood typing*. J Forensic Sci, 2011. **56 Suppl 1**: p. S179-82.
68. Shin, K.J., et al., *Population data of ABO gene applicable to human identification in Koreans*. J Forensic Sci, 2003. **48**(6): p. 1424-5.
69. Chen, D.P., et al., *Application of real-time PCR and melting curve analysis in rapid detection of Ael and Bel blood types*. Ann Clin Lab Sci, 2005. **35**(1): p. 25-30.
70. Issitt PD, A.D., *Applied Blood Group Serology*, in *Montgomery Scientific*. 1998, Durham: NC.
71. Chester, M.A. and M.L. Olsson, *The ABO blood group gene: a locus of considerable genetic diversity*. Transfus Med Rev, 2001. **15**(3): p. 177-200.
72. Lin, M. and R.E. Broadberry, *Immunohematology in Taiwan*. Transfus Med Rev, 1998. **12**(1): p. 56-72.
73. Ariani, F., et al., *Real-time quantitative PCR as a routine method for screening large rearrangements in Rett syndrome: Report of one case of MECP2 deletion and one case of MECP2 duplication*. Hum Mutat, 2004. **24**(2): p. 172-7.
74. Pont-Kingdon, G. and E. Lyon, *Rapid detection of aneuploidy (trisomy 21) by allele quantification combined with melting curves analysis of single-nucleotide polymorphism loci*. Clin Chem, 2003. **49**(7): p. 1087-94.

75. L.E, M., *Detection of energy transfer and fluorescence quenching*. In: *Nonisotopic DNA Probe Techniques*, in Academic Press. 1992, LJ Kricka, Ed: San Diego, CA
76. Downing, J. and C. Darke, *A modified PCR-SSP method for the identification of ABO blood group antigens*. Eur J Immunogenet, 2003. **30**(4): p. 295-8.
77. Sun, C.F., et al., *Molecular genetic analysis of the Bel phenotype*. Vox Sang, 2003. **85**(3): p. 216-20.
78. Ishida, K., et al., *Significance of DNA analysis for determination of ABO blood groups from hair and nail of decomposed human remains: a comparison with phenotyping by the absorption-elution method*. Leg Med (Tokyo), 2000. **2**(4): p. 212-5.
79. Hummel, S., et al., *ABO blood group genotyping of ancient DNA by PCR-RFLP*. Int J Legal Med, 2002. **116**(6): p. 327-33.
80. Olsson M.L, C.M.A., *Polymorphism and recombination events at the ABO locus: a major challenge for genomic ABO blood grouping strategies.*, in *Transfusion Med*. 2001. p. 295-313.
81. Tsai, L.C., et al., *Rapid identification of the ABO genotypes by their single-strand conformation polymorphism*. Electrophoresis, 2000. **21**(3): p. 537-40.
82. Yip, S.P., *Single-tube multiplex PCR-SSCP analysis distinguishes 7 common ABO alleles and readily identifies new alleles*. Blood, 2000. **95**(4): p. 1487-92.
83. Diamond, D.C., et al., *Genotyping the baboon ABO histo-blood group locus by two-color fluorescence SSCP*. Biotechniques, 1999. **27**(5): p. 1054-6, 1058-60, 1062.
84. Olsson, M.L., B. Thuresson, and M.A. Chester, *An Ael allele-specific nucleotide insertion at the blood group ABO locus and its detection using a sequence-specific polymerase chain reaction*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **216**(2): p. 642-7.
85. Ogasawara, K., et al., *Recombination and gene conversion-like events may contribute to ABO gene diversity causing various phenotypes*. Immunogenetics, 2001. **53**(3): p. 190-9.
86. Ogasawara, K., et al., *Extensive polymorphism of ABO blood group gene: three major lineages of the alleles for the common ABO phenotypes*. Hum Genet, 1996. **97**(6): p. 777-83.
87. H-J, B., *Phylogenetic networks.*, in *Verhandl Naturwiss* 1994, Vereins Hamburg (NF) p. 51-71.
88. W.M, F., *On the problem of discovering the most parsimonious tree*. Am Natur, 1977. **111**(223).
89. Flegel, W.A., et al., *External quality assessment in molecular immunohematology: the INSTAND proficiency test program*. Transfusion, 2013. **53**(11 Suppl 2): p. 2850-8.
90. Δημογιάννη-Ιωαννίδου Αλεξάνδρα, Μ.Γ., *Αιμοδοσία*. 1η ed. Vol. 7. 2005, Αθήνα.
91. Anstee, D.J., *Red cell genotyping and the future of pretransfusion testing*. Blood, 2009. **114**(2): p. 248-56.
92. Daniels, G., et al., *International Society of Blood Transfusion Committee on Terminology for Red Cell Surface Antigens: Cape Town report*. Vox Sang, 2007. **92**(3): p. 250-3.
93. E.B, F., *Genetics for Medical Students*. 5th ed. 1961, London, United Kingdom.

94. Poole, J. and G. Daniels, *Blood group antibodies and their significance in transfusion medicine*. Transfus Med Rev, 2007. **21**(1): p. 58-71.
95. Lin, M., *Taiwan experience suggests that RhD typing for blood transfusion is unnecessary in southeast Asian populations*. Transfusion, 2006. **46**(1): p. 95-8.
96. Oberman, H.A., B.A. Barnes, and B.A. Friedman, *The risk of abbreviating the major crossmatch in urgent or massive transfusion*. Transfusion, 1978. **18**(2): p. 137-41.
97. Walker R.H, P.H.F., Skokie I.L, *Is a crossmatch using the indirect anti-globulin test necessary for patients with a negative antibody screen*. . 1982: College of American Pathologists.
98. Chapman, J.F., C. Milkins, and D. Voak, *The computer crossmatch: a safe alternative to the serological crossmatch*. Transfus Med, 2000. **10**(4): p. 251-6.
99. Knowles, S.M., et al., *The United Kingdom National External Quality Assessment Scheme (blood transfusion laboratory practice): trends in proficiency and practice between 1985 and 2000*. Transfus Med, 2002. **12**(1): p. 11-23.
100. Vichinsky, E.P., et al., *Alloimmunization in sickle cell anemia and transfusion of racially unmatched blood*. N Engl J Med, 1990. **322**(23): p. 1617-21.
101. Josephson, C.D., et al., *Transfusion in the patient with sickle cell disease: a critical review of the literature and transfusion guidelines*. Transfus Med Rev, 2007. **21**(2): p. 118-33.
102. Stainsby, D., *ABO incompatible transfusions--experience from the UK Serious Hazards of Transfusion (SHOT) scheme Transfusions ABO incompatible*. Transfus Clin Biol, 2005. **12**(5): p. 385-8.
103. Staves, J., et al., *Electronic remote blood issue: a combination of remote blood issue with a system for end-to-end electronic control of transfusion to provide a "total solution" for a safe and timely hospital blood transfusion service*. Transfusion, 2008. **48**(3): p. 415-24.
104. G.L, D., *Human Blood Groups*. . 2nd ed. 2002, Oxford, United Kingdom.
105. Patenaude, S.I., et al., *The structural basis for specificity in human ABO(H) blood group biosynthesis*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(9): p. 685-90.
106. Lee, H.J., et al., *Structural basis for the inactivity of human blood group O2 glycosyltransferase*. J Biol Chem, 2005. **280**(1): p. 525-9.
107. Storry J.R, C.V., Helberg A, , *Pretransplantation confirmatory ABO genotyping reveals a novel non-deletional O allele* Vox Sang, 2008. **95**(178).
108. Hosseini-Maaf, B., et al., *An extensive polymerase chain reaction-allele-specific polymorphism strategy for clinical ABO blood group genotyping that avoids potential errors caused by null, subgroup, and hybrid alleles*. Transfusion, 2007. **47**(11): p. 2110-25.
109. Yazer, M.H., B. Hosseini-Maaf, and M.L. Olsson, *Blood grouping discrepancies between ABO genotype and phenotype caused by O alleles*. Curr Opin Hematol, 2008. **15**(6): p. 618-24.
110. Westhoff, C.M., *Molecular testing for transfusion medicine*. Curr Opin Hematol, 2006. **13**(6): p. 471-5.
111. Hillyer, C.D., et al., *Integrating molecular technologies for red blood cell typing and compatibility testing into blood centers and transfusion services*. Transfus Med Rev, 2008. **22**(2): p. 117-32.

112. Hashmi, G., et al., *Determination of 24 minor red blood cell antigens for more than 2000 blood donors by high-throughput DNA analysis*. Transfusion, 2007. **47**(4): p. 736-47.
113. Avent, N.D., et al., *The BloodGen project: toward mass-scale comprehensive genotyping of blood donors in the European Union and beyond*. Transfusion, 2007. **47**(1 Suppl): p. 40s-6s.
114. Redman, M., F. Regan, and M. Contreras, *A prospective study of the incidence of red cell allo-immunisation following transfusion*. Vox Sang, 1996. **71**(4): p. 216-20.
115. Higgins, J.M. and S.R. Sloan, *Stochastic modeling of human RBC alloimmunization: evidence for a distinct population of immunologic responders*. Blood, 2008. **112**(6): p. 2546-53.
116. Castilho, L., et al., *DNA-based typing of blood groups for the management of multiply-transfused sickle cell disease patients*. Transfusion, 2002. **42**(2): p. 232-8.
117. Osby, M. and I.A. Shulman, *Phenotype matching of donor red blood cell units for nonalloimmunized sickle cell disease patients: a survey of 1182 North American laboratories*. Arch Pathol Lab Med, 2005. **129**(2): p. 190-3.
118. Karpasitou, K., et al., *Blood group genotyping for Jk(a)/Jk(b), Fy(a)/Fy(b), S/s, K/k, Kp(a)/Kp(b), Js(a)/Js(b), Co(a)/Co(b), and Lu(a)/Lu(b) with microarray beads*. Transfusion, 2008. **48**(3): p. 505-12.
119. Castro, O., et al., *Predicting the effect of transfusing only phenotype-matched RBCs to patients with sickle cell disease: theoretical and practical implications*. Transfusion, 2002. **42**(6): p. 684-90.
120. Sandler, S.G., et al., *Screening with monoclonal anti-Fy3 to provide blood for phenotype-matched transfusions for patients with sickle cell disease*. Transfusion, 1997. **37**(4): p. 393-7.
121. Olujuhunbe, A., et al., *Red cell antibodies in patients with homozygous sickle cell disease: a comparison of patients in Jamaica and the United Kingdom*. Br J Haematol, 2001. **113**(3): p. 661-5.
122. da Costa, D.C., et al., *Molecular matching of red blood cells is superior to serological matching in sickle cell disease patients*. Rev Bras Hematol Hemoter, 2013. **35**(1): p. 35-8.
123. Goebel, M., et al., *A Novel ABO Gene Variant Leads to Discrepant Results in Forward/Reverse and Molecular Blood Grouping*. Transfus Med Hemother, 2013. **40**(6): p. 454-8.
124. Garratty G, R.M., Westhoff C. , *A workshop on molecular methods in immunohematology*. Transfusion, 2007. **47**(1): p. 1-100.
125. Gassner, C., et al., *ABO glycosyltransferase genotyping by polymerase chain reaction using sequence-specific primers*. Blood, 1996. **88**(5): p. 1852-6.
126. Flegel, W.A., et al., *Rh phenotype prediction by DNA typing and its application to practice*. Transfus Med, 1998. **8**(4): p. 281-302.
127. Rozman, P., T. Dovc, and C. Gassner, *Differentiation of autologous ABO, RHD, RHCE, KEL, JK, and FY blood group genotypes by analysis of peripheral blood samples of patients who have recently received multiple transfusions*. Transfusion, 2000. **40**(8): p. 936-42.
128. Prager, M., *Molecular genetic blood group typing by the use of PCR-SSP technique*. Transfusion, 2007. **47**(1 Suppl): p. 54s-9s.

129. Fasano, R.M., et al., *RH genotyping in a sickle cell disease patient contributing to hematopoietic stem cell transplantation donor selection and management*. Blood, 2010. **116**(15): p. 2836-8.
130. Denomme, G.A. and M. Van Oene, *High-throughput multiplex single-nucleotide polymorphism analysis for red cell and platelet antigen genotypes*. Transfusion, 2005. **45**(5): p. 660-6.
131. Perreault, J., et al., *Set-up and routine use of a database of 10,555 genotyped blood donors to facilitate the screening of compatible blood components for alloimmunized patients*. Vox Sang, 2009. **97**(1): p. 61-8.
132. St-Louis, M., et al., *[Genotyping of 21,000 blood donors in Quebec and RHD analysis]*. Transfus Clin Biol, 2010. **17**(4): p. 242-8.
133. Hopp, K., et al., *High-throughput red blood cell antigen genotyping using a nanofluidic real-time polymerase chain reaction platform*. Transfusion, 2010. **50**(1): p. 40-6.
134. Weber KM, F.J., Piefer CL, , *Identifying rare blood donors: a study in on-time high throughput red cell genotyping*. . Transfusion, 2010. **50**(174A).
135. Flegel, W.A., *ABO genotyping: the quest for clinical applications*. Blood Transfus, 2013. **11**(1): p. 6-9.
136. Fichou, Y., et al., *Next-generation sequencing is a credible strategy for blood group genotyping*. Br J Haematol, 2014. **167**(4): p. 554-62.
137. Loman, N.J., et al., *Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms*. Nat Biotechnol, 2012. **30**(5): p. 434-9.