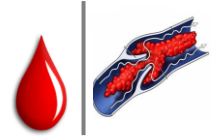




ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ



Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

ΘΡΟΜΒΩΣΗ – ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΑ – ΙΑΤΡΙΚΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΓΙΣΕΩΝ

Διπλωματική Εργασία

«ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΟΜΑΔΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ DUFFY – Η ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ ΤΟΥ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ DUFFY ΣΤΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΟ
ΠΛΗΘΥΣΜΟ»

ΟΝΟΜΑ : ΧΑΪΚΑΛΗ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

Αριθμός Μητρώου: 20181421

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ : Καθ. ΜΑΡΙΑΝΝΑ ΠΟΛΙΤΟΥ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας τη διπλωματική μου εργασία και τον κύκλο σπουδών στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών «Θρόμβωση - Αιμορραγία – Ιατρική των Μεταγγίσεων», θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που με βοήθησαν στην ολοκλήρωσή του.

Την Καθηγήτρια Αιματολογίας και Επιστημονική Υπεύθυνη του Προγράμματος κα. Μαριάννα Πολίτου, η οποία αφενός, με ενθάρρυνε να ενταχθώ στο πρόγραμμα, κάτι που για διάφορους λόγους διαρκώς ανέβαλα, και αφετέρου, με στήριξε σε όλη τη διάρκεια του κύκλου σπουδών με τις συμβουλές και τη καθοδήγησή της.

Την Ομότιμη Καθηγήτρια κα Ανθή Τραυλού για τη στήριξη και τη μεταφορά των πλούσιων γνώσεων και εμπειριών της.

Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Αργυρή Γιαλεράκη, μέλος της τριμελούς επιτροπής εξέτασης της διπλωματικής μου, για τη στήριξη και τη βοήθειά της καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Τον Διευθυντή μου, Επιστημονικό Διευθυντή του Ε.ΚΕ.Α, κο Κωνσταντίνο Σταμούλη, που είναι πάντα ανοιχτός σε νέες τεχνολογίες και νέες επιστημονικές ιδέες, καθώς με τη δικιά του έγκριση και απόφαση στήθηκε το εργαστήριο «μοριακής τυποποίησης ερυθροκυτταρικών αντιγόνων».

Τους αξιότιμους ιατρούς των ΜΜΑ και Αιμοδοσιών που μας εμπιστεύτηκαν και έστειλαν τα δείγματά τους, από τη μελέτη των οποίων προέκυψαν και τα αποτελέσματα της εργασίας μου.

Την ομάδα των τεχνολόγων, που με ευσυνειδησία και υπευθυνότητα υποστηρίζει κάθε δραστηριότητα του εργαστηρίου Ανοσοαιματολογίας και ειδικότερα τη συνάδελφο Βενετία Καβαλάρη, που με υποδειγματική προθυμία και ευσυνειδησία, δούλεψε μαζί μου το εργαστηριακό μέρος της εργασίας .

Τέλος, την οικογένειά μου, που επίσης με στήριξε και με βοήθησε να ανταπεξέλθω στις απαιτήσεις του προγράμματος.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το σύστημα Duffy, μετά την ανακάλυψη και την περιγραφή του 70 περίπου χρόνια πριν, αποτελεί αντικείμενο μελέτης και έρευνας τόσο για την κλινική του σημασία όσο και το ρόλο του στο χαρακτηρισμό των διαφορετικών πληθυσμών του πλανήτη και στην αξιολόγηση της μεταξύ τους συγγένειας. Τα Fy(a) και Fy(b) αντιγόνα του συστήματος Duffy κωδικοποιούνται από τα αντίστοιχα αλληλία (FY*A, FY*B), τα οποία διαφέρουν κατά μία βάση (125G>A) και καθορίζουν τους φαινότυπους Fy(a+b+), Fy(a+b-), Fy(a-b+). Ο φαινότυπος Fy(a-b-), είναι κοινός στους Αφρικανούς και σπάνιος στους Καυκάσιους. Είναι αποτέλεσμα της σημειακής μετάλλαξης -67T>C στο GATA box του γονιδίου FY, που αναστέλλει την έκφραση του γονιδίου. Επιπλέον παραλλαγές του γονιδίου FY*B, με σημαντικότερη τη μετάλλαξη 265C>T, τροποποιούν την έκφραση του αντιγόνου Fy(b) με αποτέλεσμα ασθενή ή διαφορούμενα ορολογικά αποτελέσματα.

ΣΚΟΠΟΣ: Η μελέτη του Ελληνικού πληθυσμού ως προς το σύστημα Duffy και η καταγραφή των συχνοτήτων των αλληλίων, όπως προκύπτουν από την μοριακή ανάλυση του γονοτύπου, με έμφαση στην ανίχνευση του φαινότυπου Fy(b+^{weak}).

ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ: Εξετάστηκαν **1043** δείγματα από διάφορες περιοχές της Ελλάδος, που εστάλησαν στο εργαστήριο Ανοσοαιματολογίας του Ε.ΚΕ.Α για περαιτέρω διερεύνηση του ερυθροκυτταρικού τους φαινότυπου με μοριακή μέθοδο. Απομονώθηκε DNA από περιφερικό αίμα και τυποποιήθηκαν με τη μοριακή μέθοδο Human Erythrocyte Antigen BeadChip, 11 αντιγονικά συστήματα, μεταξύ των οποίων το σύστημα Duffy. Για την τυποποίηση του συστήματος Duffy, η μέθοδος ανιχνεύει τους τρεις πολυμορφισμούς: 125G>A(Fya/Fyb), -67T>C(GATA,silencingFY),265C>T(FY^x[Fy(b+^{weak})]).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων προέκυψαν οι συχνότητες φαινότυπων και αλληλίων στον Ελληνικό πληθυσμό, που είναι σύμφωνες με τα αποτελέσματα του 1000 Genome Project, όπως αναλύονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 1 – Κατανομή των συχνοτήτων των FY φαινότυπων

ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ % ΦΑΙΝΟΤΥΠΩΝ				ΑΛΛΗΛΙΑ
	ΕΥΡΩΠΗ	ΑΦΡΙΚΗ	ΑΣΙΑ	ΕΛΛΑΔΑ	
Fy(a+b+)	48	3	9	44	FY*A/FY*B
Fy(a-b+)	32	20	1.8	33.93	FY*B/FY*B
Fy(a+b-)	20	10	89.2	19.08	FY*A/FY*A
Fy(a-b-)	σπάνιο	67	0	0.29	FY*
Fy(a+bw)				2.30	
Fy(a-bw)				0.38	

Πίνακας 2 – Συχνότητες αλληλίων σύμφωνα με το 1000 Genome Project

ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ ΑΛΛΗΛΙΩΝ					
ΑΛΛΗΛΙΑ	ΕΥΡΩΠΗ	ΑΦΡΙΚΗ	ΑΣΙΑ E/S	ΜΕΞΙΚΑΝΟΙ ΑΜΕΡΙΚΗΣ	ΕΛΛΑΔΑ
c.125G>A rs12075*G <i>FY*01 (FY*A)</i>	0,398	0,019	0,923/0.640	0,461	0,420
c.125G>A rs12075*A <i>FY*02 (FY*B)</i>	0,602	0,981	0.077/0.360	0,539	0,580
c.265C>T rs34599082*T <i>FY*02W.01</i>	0,013	0,000	0.001/0.004	0,007	0,028

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ: Οι συχνότητες των αλληλίων που καταγράφηκαν για τον ελληνικό πληθυσμό συμφωνούν με τις συχνότητές τους στους Καυκάσιους, όπως αυτές καταγράφηκαν σε άλλες μελέτες και στο 1000 Genome Project. Επιπλέον, φαίνεται ότι η μοριακή τυποποίηση είναι απαραίτητη σε περιπτώσεις αποκλίσεων, όπως στη περίπτωση που ασθενής έκφραση του *Fyb* μπορεί να χαρακτηριστεί ως αρνητικός φαινότυπος.

ABSTRACT

The Duffy antigen system, after its discovery and description about 70 years ago, is a subject of study and research not only due to its clinical importance but also its role in the characterization of the different populations on our planet and the assessment of their affinity. The Fy(a) and Fy(b) antigens of the Duffy system are coded by the corresponding alleles (FY*A, FY*B) which differ by one base (125G>A) and determine the phenotypes Fy(a+b+), Fy(a+b-), Fy(a-b+). The phenotype Fy(a-b-) is common in Africans and rare in Caucasians. It is the result of the point mutation -67T>C in the GATA box of the FY gene which inhibits the expression of the gene. In addition, variations of the FY*B gene, the most important of them being the 265C>T mutation, modify the expression of the antigen Fy(b), resulting in weak or ambiguous serological results.

GOAL: The study of the Greek population regarding the Duffy system and the register of the frequency of the alleles as they result from the molecular analysis of the genotype, with emphasis on the detection of the Fy(*b +^{weak}*) phenotype.

MATERIAL – METHOD: 1043 samples from several regions of Greece were examined, which were sent to the Immunohematology laboratory of the National Blood Center for further investigation of their red blood cell phenotype with a molecular method. DNA was extracted from peripheral blood and 11 antigenic systems, among which the Duffy system, were standardized with the molecular method Human Erythrocyte Antigen BeadChip. For the standardization of the Duffy system the method detects the three polymorphisms: 125G>A(Fya/Fyb), -67T>C(GATA,silencingFY), 265C>T(FY^x[Fy(*b +^{weak}*)])

RESULTS: From the processing of the results occurred the frequencies of phenotypes and alleles in the Greek population, which are consistent with the results of the 1000 Genome Project, as analyzed in the following tables:

Table 1 – Duffy phenotype frequencies

PHENOTYPE	PHENOTYPE FREQUENCIES				ALLELES
	EUROPE	AFRICA	ASIA	GREECE	
Fy(a+b+)	48	3	9	44	FY*A/FY*B
Fy(a-b+)	32	20	1.8	33.93	FY*B/FY*B
Fy(a+b-)	20	10	89.2	19.08	FY*A/FY*A
Fy(a-b-)	σπάνιο	67	0	0.29	FY*
Fy(a+bw)				2.30	
Fy(a-bw)				0.38	

Table 2 – Allele frequencies according to the 1000 Genome Project

ALLELE FREQUENCIES					
ALLELES	EUROPE	AFRICA	ASIA E/S	MEXICAN- AMERICAN	GREECE
c.125G>a rs12075*G Fy(a+)	0,398	0,019	0,923/0.640	0,461	0,418
c.125G>A rs12075*A Fy(b+)	0,602	0,981	0.077/0.360	0,539	0,580
c.265C>T rs34599082*T Fy(b+ ^{weak})	0,013	0,000	0.001/0.004	0,007	0,028

CONCLUSION: The frequencies of the alleles that were registered for the Greek population are consistent with their frequencies in Caucasians as registered in other studies and in the 1000 Genome Project. Furthermore, it appears that the molecular typing is essential in cases of discrepancies, such as the case where a weak expression of the Fyb can be characterized as negative phenotype.

Π Ε Ρ Ι Ε Χ Ο Μ Ε Ν Α

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9-10
I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	10-33
1. ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ DUFFY	10-25
1.1 Ιστορικά στοιχεία	10-11
1.2 Αντιγόνα Duffy – Φαινότυποι	11-13
1.3 Μοριακή Δομή – Γενετική & Κληρονομικότητα	13-19
1.4 Γεωγραφική Κατανομή	19-23
1.5 Βιοχημεία	23-25
2. ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ	25-28
2.1 DARC και Malaria	26-27
2.2 DARC και Νεφρική Ανεπάρκεια	27-28
3. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ DUFFY	28-30
3.1 Anti-Fy ^a , -Fy ^b	28-29
3.2 Anti-Fy3, -Fy4, -Fy5, και -Fy6	29-30
4. ΑΝΟΣΟΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑ	30-31
5. ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ	31-33
II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	34-74
1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	34
2. ΥΛΙΚΟ	34
3. ΜΕΘΟΔΟΙ	34-56
3.1 Απομόνωση DNA	34-35
3.2 Μοριακή Ανάλυση	35-40
3.3 Διαδικασία	40-53
3.4 Περιορισμοί της μεθόδου	53-54
3.5 Χαρακτηριστικά απόδοσης μεθόδου	54-56
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	56-74

III. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	75-77
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	78-83

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα συστήματα ομάδων αίματος χαρακτηρίζονται από τη παρουσία ή την απουσία των αντίστοιχων αντιγόνων στη ερυθροκυτταρική μεμβράνη, τα οποία είναι συχνά πολυμορφικά ως προς τη δομή και τη λειτουργία τους [1]. Επί του παρόντος, σύμφωνα με τη Διεθνή Κοινότητα Μεταγγισιοθεραπείας (ISBT), έχουν χαρακτηριστεί 346 ερυθροκυτταρικά αντιγόνα, τα οποία διαμοιράζονται σε 36 διαφορετικά συστήματα ομάδων αίματος[2].

Τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα κληρονομούνται γενετικά και καθορίζονται από συγκεκριμένες αμινοξικές αλληλουχίες, οι οποίες οδηγούν στη δημιουργία πρωτεϊνών που συνδέονται είτε με λιπίδια είτε με υδατάνθρακες [3]. Αυτά τα αντιγόνα είναι πολύ σημαντικά στο πεδίο της μεταγγισιοθεραπείας, καθότι η απουσία τους από την ερυθροκυτταρική μεμβράνη ενός ατόμου μπορεί να οδηγήσει στην αλλοανοσοποίησή του στη περίπτωση που μεταγγιστεί με ερυθρά που φέρουν το αντίστοιχο αντιγόνο. Ανάμεσα στις πολλές και ποικίλες επιπτώσεις της αλλοανοσοποίησης, ξεχωρίζουν για το βαθμό σοβαρότητάς τους: ο αυξημένος κίνδυνος αντιδράσεων μετά τη μετάγγιση, ο περιορισμένος αριθμός συμβατών μονάδων, η καταστροφή των αλλογενών ερυθροκυττάρων, καθώς και των αυτόλογων και των εμβρυϊκών ερυθροκυττάρων επιπλέον της καταστροφής του μεταμοσχευμένου ιστού [4].

Ο περιορισμός της πιθανότητας ένα άτομο που μεταγγίζεται να αναπτύξει αλλοαντισώματα συνίσταται στη μετάγγιση φαινοτυπικά συμβατού αίματος ως προς τα σημαντικότερα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα [5]. Παρότι η φαινοτύπηση, με ορολογικές μεθόδους, είναι πρωταρχικής σημασίας τόσο για την επιβεβαίωση της παρουσίας αλλοαντισωμάτων, όσο και για την ανίχνευση των ερυθροκυτταρικών αντιγόνων [6-8], διάφοροι τεχνικοί περιορισμοί, όπως η υποκειμενικότητα της εξέτασης, η έλλειψη εμπορικά διαθέσιμων αντιορών, καθώς και η συχνά πολύπλοκη και πολύωρη εκτέλεσή τους, την καθιστούν ανεπαρκή. Κλινικοί επίσης περιορισμοί, όπως πρόσφατα μεταγγισμένοι ασθενείς, ερυθρά επικαλυμμένα με IgG ή ακόμα και η αδυναμία διάκρισης ενός αυτοαντισώματος από ένα αλλοαντίσωμα σε θετικά για το αντιγόνο άτομα, οδηγούν στην αναζήτηση επιπλέον μεθόδων που θα μπορούν να δώσουν απαντήσεις και λύσεις σε τέτοια προβλήματα [9].

Οι μοριακές μέθοδοι που αναπτύχθηκαν και εφαρμόστηκαν στο πεδίο της ιατρικής των μεταγγίσεων αποδείχθηκαν μια εξαιρετική απάντηση σε όλα τα παραπάνω προβλήματα και μια καλή εναλλακτική στις κλασσικά εφαρμοζόμενες ορολογικές τεχνικές φαινοτύπησης [10,11].

Οι κύριες ενδείξεις εφαρμογής τέτοιων τεχνικών στην Ανοσοαιματολογία είναι η ταυτοποίηση ερυθροκυτταρικών αντιγόνων σε πρόσφατα μεταγγισμένους ασθενείς, σε ασθενείς με θετική άμεση δοκιμασία αντισφαιρινικού ορού, καθώς και στις περιπτώσεις στις οποίες υπάρχει κίνδυνος ανάπτυξης Αιμολυτικής Νόσου Εμβρύου ή Νεογνού (HDFN) [7,12,13]. Οι μοριακές τεχνικές μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση γονιδιακών πολυμορφισμών που οδηγούν σε ασθενή έκφραση των αντίστοιχων αντιγόνων στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη, συμβάλλοντας έτσι στην αποφυγή αιμολυτικών αντιδράσεων μετά από μετάγγιση [6].

Τα αντιγόνα του συστήματος Duffy είναι υψίστης σημασίας στην ιατρική των μεταγγίσεων, καθώς μπορεί να προκαλέσουν, αν και σπάνια, σοβαρές μετα-μετάγγιση αντιδράσεις, όπως και Αιμολυτική Νόσο του Εμβρύου ή του Νεογνού (HDFN). Η μοριακή τυποποίηση του ερυθροκυτταρικού φαινοτύπου ως προς το σύστημα αυτό, φαίνεται ότι μπορεί να αποτελέσει ένα πολύτιμο και απαραίτητο συμπλήρωμα στη κλασσική φαινοτύπηση, δίνοντας άμεσες λύσεις στα προαναφερθέντα προβλήματα.

I: ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ DUFFY

1.1 Ιστορικά Στοιχεία

Πρώτη αναφορά στο σύστημα Duffy γίνεται σε δημοσίευση του 1950, όπου καταγράφεται η παρουσία αντισωμάτων anti-Fya κατόπιν διερεύνησης περιστατικού που παρουσίασε αιμολυτική αντίδραση μετά μετάγγιση [14,15]. Το περιστατικό αφορούσε άτομο ομάδος O, RhD-, ηλικίας 43 ετών με αιμορροφιλία, που μεταγγίστηκε με 3 μονάδες αίματος με σκοπό την αντιμετώπιση αυτόματων αιμορραγικών εκδηλώσεων. Μετά τη μετάγγιση ο ασθενής παρουσίασε έντονο ρίγος και ίκτερο.

Στον εργαστηριακό έλεγχο του περιστατικού καταγράφηκε ένα αντίσωμα, το οποίο μπορούσε να ανιχνεύσει μόνο μία έμμεση δοκιμασία αντισφαιρινικού ορού (IAT) και ονομάστηκε anti-Duffy (anti-Fya) από το όνομα του ασθενή.

Ακολούθησε σχετική έρευνα που είχε ως αποτέλεσμα τη καταγραφή συχνότητας 64,9% του Fya φαινοτύπου, καθώς και τις συχνότητες των υπεύθυνων γονιδίων: του Fya και του υποθετικού, τότε, Fyb.

Ένα χρόνο μετά, ανακαλύφθηκε το αντίσωμα anti-Fyb από τους Ikin et al [16], σε ασθενή 2 ημέρες μετά τη γέννηση του τρίτου τέκνου της. Κανένα παιδί δεν είχε στοιχεία HDN. Κατά την εφαρμογή των τεχνικών ανίχνευσης αντισωμάτων διαπιστώθηκε ότι η παρουσία αλβουμίνης στο διάλυμα καθώς και η θερμοκρασία των 37° C, έδιναν ισχυρότερη αντίδραση. Τα νέα δεδομένα ως προς τη συχνότητα του Fyb φαινοτύπου επιβεβαίωσαν αρχικές υποθέσεις και υπολογισμούς. Ενδιαφέρουσα επίσης, ήταν η υπόθεση των συγγραφέων για την ύπαρξη τρίτου αλληλομόρφου, το οποίο όμως δεν θα έδινε αντίδραση με αντίσωμα.

1.2 Αντιγόνα Duffy - Φαινότυποι

Το σύστημα Duffy περιλαμβάνει 6 γνωστά αντιγόνα τα οποία διαφέρουν στην αμινοξική τους αλληλουχία. Η συχνότητά τους ποικίλλει μεταξύ διαφορετικών φυλετικών ομάδων.

Τα κύρια αντιγόνα του συστήματος Duffy είναι τα Fya (FY1) και Fyb (FY2), δύο πολυμορφικά και αντιθετικά αντιγόνα που διαφέρουν μεταξύ τους κατά ένα αμινοξύ στη θέση 42 της εξωκυττάριας περιοχής της Duffy διαμεμβρανικής πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, το αμινοξύ γλυκίνη οδηγεί στην έκφραση του αντιγόνου Fya και το ασπαρτικό οξύ στην έκφραση του αντιγόνου Fyb.[17,19] Και τα δύο αντιγόνα είναι ευαίσθητα στην επεξεργασία των ερυθρών με πρωτεολυτικά ένζυμα, όπως η παπαΐνη ή η φισίνη, ενώ δεν επηρεάζονται από την επεξεργασία των ερυθρών με τρυψίνη [18]. Η παρουσία τους ή μη στα ερυθροκύτταρα καθορίζει 4 κύριους φαινότυπους: Fy(a+b+), Fy(a+b), Fy(a-b+) και Fy(a-b-) (Πίνακας 1) [21].

Το αντιγόνο Fya απαντά σε ποσοστό 66% στους Καυκάσιους, 10% στους Αφρικανούς και 99% στους Ασιάτες. Έχει ταυτοποιηθεί σε εμβρυϊκά RBCs σε μόλις 6 εβδομάδων κύηση και φτάνει τα επίπεδα των ενηλίκων σε περίπου 12 εβδομάδες μετά τη γέννηση. Το αντιγόνο Fyb απαντά σε ποσοστό 83% στους Καυκάσιους, 23% στους Αφρικανούς και 18,5% στους Ασιάτες. Εκφράζεται στα κύτταρα του ομφάλιου λώρου.

Σχετικά με τα υπόλοιπα αντιγόνα του συστήματος Duffy, το Fy3 εκφράζεται σε ποσοστό 100% στους Καυκάσιους, 32% στους Αφρικανούς και 99,9% στους Ασιάτες. Εκφράζεται και αυτό στα κύτταρα του ομφάλιου λώρου και αυξάνεται σημαντικά μετά τη γέννηση. Το Fy5 εκφράζεται σε ποσοστό 32% στους Αφρικανούς και 99,9%

στους Καυκάσιους και Ασιάτες. Δεν εκφράζεται στα Rhesus αρνητικά ερυθρά. Το Fy6 αντιγόνο εκφράζεται στο 100% των περισσοτέρων πληθυσμών και 32% στους Αφρικανούς [21].

Πίνακας 1: Duffy blood group system phenotypes and prevalence. *The Duffy Blood Group System, Fatima A. Aldarweesh, DOI:http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.89952*

Red cell phenotype	Prevalence (%)		Allele
	Caucasians	Blacks	
Fy (a+b-)	17	9	FY*01/FY*01 or FY*A/FY*A
Fy (a-b+)	34	22	FY*02/FY*02 or FY*B/FY*B
Fy (a+b+)	49	1	FY*A/FY*B
Fy (a-b-)	Rare	68	FY*/N.01-05, FY*/N.01-02‡
Fy ³	100	32	
Fy ⁵	99.9	32	
Fy ⁶	100	32	

‡Nomenclature approved by the ISBT working party on terminology for red cell surface antigens.

Οι επίτοποι, που αναγνωρίζονται από μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των Fy3 και Fy6 έχουν χαρακτηριστεί (**Εικόνα 1**). Συγκεκριμένα, ο επίτοπος Fy3 εντοπίζεται στη τρίτη εξωκυττάρια λούπα [21]. Ο Fy3, όπως και ο Fy5, δεν επηρεάζονται κατά την επεξεργασία των ερυθρών με πρωτεολυτικά ένζυμα [18]. Ο επίτοπος Fy6 εντοπίζεται στο αμινο-τελικό άκρο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, πλησίον των Fya/Fyb και καθορίζεται από αμινοξέα που βρίσκονται ανάμεσα στις θέσεις 31 και 40 [22]. Αντίθετα με τον Fy3, ο Fy6 καταστρέφεται όταν τα ερυθρά επεξεργαστούν με ένζυμα, ενώ, όπως και τα Fya, Fyb δεν επηρεάζεται κατά την επεξεργασία με τρυψίνη [18].

Ο φαινότυπος Fy(a-b+^w) συνδέεται με ασθενή έκφραση του Fyb, με την έκφραση των τύπων Fy3 και Fy6 και προκύπτει από μετάλλαξη στο γονίδιο *FY*B*. Μετάλλαξη στη θέση 89 της πρώτης λούπας στο ενδοκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης που συνδέεται με το φαινότυπο Fyx, έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ασταθούς πρωτεΐνης. Αυτή η αμινοξική αλλαγή προκαλεί μια ποσοτική μείωση της πρωτεΐνης που παράγεται και, κατά συνέπεια, χαμηλή έκφραση των Fyb, Fy3 και Fy6 αντιγόνων. Η μετάλλαξη

προκύπτουν από διαφορετικούς εκκινητές και έχουν ως αποτέλεσμα διακριτά πρωτεϊνικά προϊόντα.

Το μείζον μετάγραφο του γονιδίου *ACKR1* προκύπτει από τα εξώνια 1 και 2, ενώ το ελλάσον ξεκινά από την αρχή του εξωνίου 2. Τα δύο μετάγραφα παράγουν αντίστοιχα: την ισομορφή A (NM_001122951.2/NP_001116426.1), που κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη με 338 αμινοξέα και την ισομορφή B (NM_002036.3/NP_002027.2), η οποία κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη με 336 αμινοξέα, 7 αμινοξέα από το εξώνιο 1 και 329 αμινοξέα από το εξώνιο 2 [28] (**Εικόνα 2**). Η ισομορφή B έχει επιλεγεί ως η «κανονική» αλληλουχία και χρησιμοποιείται για τη γονοτύπηση του συστήματος Duffy, καθότι εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα της ερυθράς σειράς. Μέσα στη περιοχή του εκκινητή υπάρχουν θέσεις πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων, όπως οι Sp1, AP2, GATA-1, με σημαντικότερη τη θέση GATA.

Ο αριθμός των νουκλεοτιδίων καθώς και των αμινοξέων στις αλληλουχίες του *ACKR1* επαναπροσδιορίστηκε μετά την ανακάλυψη ότι το ματισμένο mRNA είναι το κύριο προϊόν του γονιδίου. Προτάθηκε το πρώτο νουκλεοτίδιο που συνδέεται με το κωδικόνιο έναρξης της μεταγραφής του μείζονος ματισμένου μεταγράφου να αριθμηθεί ως 1. Αυτή η συμφωνία για την αρίθμηση αποφεύγει ανακρίβειες που δημιουργούνται από τα διαφορετικά μήκη των 5' μη μεταγραφόμενων περιοχών όπως προκύπτουν από εναλλακτικές θέσεις εκκίνησης της μεταγραφής [17]. Η ισομορφή B έχει επιλεγεί ως η «κανονική» αλληλουχία και χρησιμοποιείται για τη γονοτύπηση του συστήματος Duffy, καθότι εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα της ερυθράς σειράς.

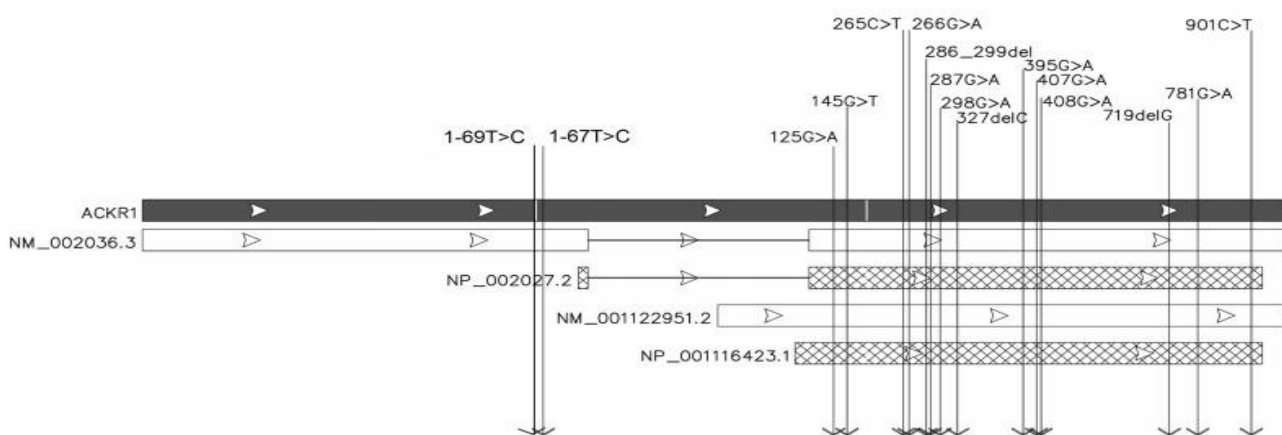
Τα αντιγόνα Fya και Fyb κωδικοποιούνται από τα συνεπικρατή αλληλόμορφα *FY*A(FY*01)* και *FY*B(FY*02)* του γονιδίου *FY*, που διαφέρουν μεταξύ τους κατά μία βάση, η οποία προκύπτει από απλή νουκλεοτιδική αντικατάσταση (SNP) στη θέση c.125G>A (rs12075) [26,27]. Στο αλληλόμορφο *FY*A*, η νουκλεοτιδική βάση είναι η γουανίνη (G), ενώ στο αλληλόμορφο *FY*B* είναι η αδενίνη (A). Η συγκεκριμένη μετάλλαξη δημιουργεί ένα κωδικόνιο για γλυκίνη στο *FY*A* αλληλόμορφο και ένα κωδικόνιο για ασπαρτικό οξύ στο *FY*B* αλληλόμορφο στη θέση 42 του κύριου προϊόντος (p.Gly42Asp).

Άλλες γενετικές παραλλαγές που έχουν ταυτοποιηθεί, προκαλούν ασθενή (weak : +^w ή *W) ή και null (0 ή *N) έκφραση των Fya και Fyb αντιγόνων (**Πίνακας 2**). Σύμφωνα με το ISBT (Διεθνή Κοινότητα Μεταγγισιοθεραπείας) υπάρχουν δύο μεταλλάξεις που συνδέονται με την ασθενή έκφραση του Fya και πέντε μεταλλάξεις που συνδέονται με την ασθενή έκφραση του Fyb . Επτά μεταλλάξεις οι οποίες οδηγούν σε μη (null)

έκφραση του Fya έχουν ήδη παρατηρηθεί και 3 τέτοιες μεταλλάξεις έχουν βρεθεί και για το Fyb.

Fy(a-b-) φαινότυπος

Ο αρνητικός φαινότυπος Fy(a-b-), επίσης γνωστός και ως «erythrocyte silent» (Fy^{es}) απαντά σε άτομα της Αφρικανικής φυλής με συχνότητα, ανάλογα με τη περιοχή, που αγγίζει το 100% (π.χ. Δυτική Αφρική) και το 80% σε Αφροαμερικάνους [29,30] Σχετίζεται με τη καταστολή της έκφρασης των Duffy αντιγόνων στην ερυθρά σειρά



Εικόνα 2 - *ACKR1* gene structure and proteins and mRNA isoforms.

Viewing the figure from top to bottom: the black box represents the *ACKR1* gene, the white box shows the mRNA of isoform B ([NM_002036.3](#)) and the dashed box shows the isoform B protein ([NP_002027.2](#)); the next white box represents the mRNA of isoform A ([NM_001122951.2](#)) and the dashed box shows the protein of isoform A ([NP_001116423.1](#)). The arrows indicate the positions of the main genetic variants already described in this gene. Gabriela Hoher, Marilu Fiegenbaum, Silvana Almeida, *Molecular basis of the Duffy blood group system*, *Blood Transfus* 2018; 16:93-100

και κωδικοποιείται από το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο *FY*B^{ES}* (*FY*02N.01*) όταν απαντά σε ομοζυγωτία [31].

Το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο είναι το αποτέλεσμα μιας απλής νουκλεοτιδικής αλλαγής T>C (rs2814778) στη θέση c.1-67 του εκκινητή του *FY* γονιδίου μέσα στο ανεστραμμένο μοτίβο GATA (TTA**T**CT>TTA**C**CT). Η μετάλλαξη αυτή μπλοκάρει τη λειτουργία του εκκινητή στα ερυθροειδικά κύτταρα εμποδίζοντας τη πρόσδεση του ερυθροειδικού μεταγραφικού παράγοντα GATA-1 στην ειδική αλληλουχία πρόσδεσης (GATA box) [31]. Οι αλληλουχίες GATA είναι πολλές και διάσπαρτες στο γονιδίωμα

και λειτουργούν ως εκκινητές πολλών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που συμμετέχουν στην αιμοποίηση [32].

Πίνακας 2: Variants of the Duffy blood group system

Gabriela Hoher, Marilu Fiegenbaum, Silvana Almeida, *Molecular basis of the Duffy blood group system, Blood Transfusion 2018; 16:93-100*

Fy expression	Allele name	Nucleotide	Region	Amino acid	dbSNP
Fy(a+)	<i>FY*01</i>	c.125G	Exon 2	p.Gly42	rs12075
Fy(b+)	<i>FY*02</i>	c.125G>A	Exon 2	p.Gly42Asp	rs12075
Null alleles					
<i>Fy(a) null</i>					
Fy(a-) erythroid cells only	<i>FY*01N.01</i>	c.1-67T>C	5'UTR	p.0	rs2814778
Fy(a-)	<i>FY*01N.02</i>	c.286_299del	Exon 2	p.Trp96Thrfs	rs587776507
Fy(a-)	<i>FY*01N.03</i>	c.408G>A	Exon 2	p.Trp136Ter	-
Fy(a-)	<i>FY*01N.04</i>	c.287G>A	Exon 2	p.Trp96Ter	rs750052723
Fy(a-)	<i>FY*01N.05</i>	c.327delC	Exon 2	p.Phe109fs	-
Fy(a-)	<i>FY*01N.06</i>	c.395G>A	Exon 2	p.Gly132Asp	rs530992295
Fy(a-)	<i>FY*01N.07</i>	c.719delG	Exon 2	p.Gly240fs	-
Fy(a-)	-	c.1-69T>C	5'UTR	p.0	-
<i>Fy(b) null</i>					
Fy(b-) erythroid cells only, Fy ^{ES}	<i>FY*02N.01</i>	c.1-67T>C	5'UTR	p.0	rs2814778
Fy(b-)	<i>FY*02N.02</i>	c.407G>A	Exon 2	p.Trp136Ter	rs76819093
Fy(b-)	<i>FY*02N.03</i>	c.781G>A	Exon 2	p.Gly261Arg	-
Weak alleles					
<i>Fy(a) weak</i>					
Fy(a ^W)	<i>FY*01W.01</i>	c.265C>T	Exon 2	p.Arg89Cys	rs34599082
Fy(a ^W)	<i>FY*01W.02</i>	c.265C>T, 298G>A	Exon 2	p.Arg89Cys, Ala100Thr	rs34599082, rs13962
<i>Fy(b) weak</i>					
Fy(b ^W), Fy ^X	<i>FY*02W.01</i>	c.265C>T, 298G>A	Exon 2	p.Arg89Cys, Ala100Thr	rs34599082, rs13962
Fy(b ^W), Fy ^X	<i>FY*02W.02</i>	c.145G>T, c.265C>T, 298G>A	Exon 2	p.Ala49Ser, Arg89Cys, Ala100Thr	- rs34599082, rs13962
Fy(b ^W)	<i>FY*02W.03</i>	c.266G>A	Exon 2	p.Arg89His	rs371909350
Fy(b ^W)	<i>FY*02W.04</i>	c.901C>T	Exon 2	p.Pro301Ser	rs753831902

The nucleotide position is based on NCBI data. fs: frameshift; UTR: untranslated region.

Η παραπάνω μετάλλαξη εμποδίζει την έκφραση του Fy^b αντιγόνου στα ερυθροκύτταρα, αλλά όχι στα κύτταρα άλλων ιστών. Σύμφωνα με αυτό, Duffy mRNA ανιχνεύεται σε ιστούς όπως πνεύμονες, σπλήνα και γαστρεντερικό σωλήνα, ενώ δεν ανιχνεύεται σε κύτταρα από το μυελό των οστών, με αποτέλεσμα, Αφρικανοί με το φαινότυπο $Fy(a-b-)$ πολύ σπάνια αναπτύσσουν anti- Fy^b αντισώματα όταν μεταγγιστούν με ερυθρά θετικά για τα αντιγόνα Duffy. [27,33,34]

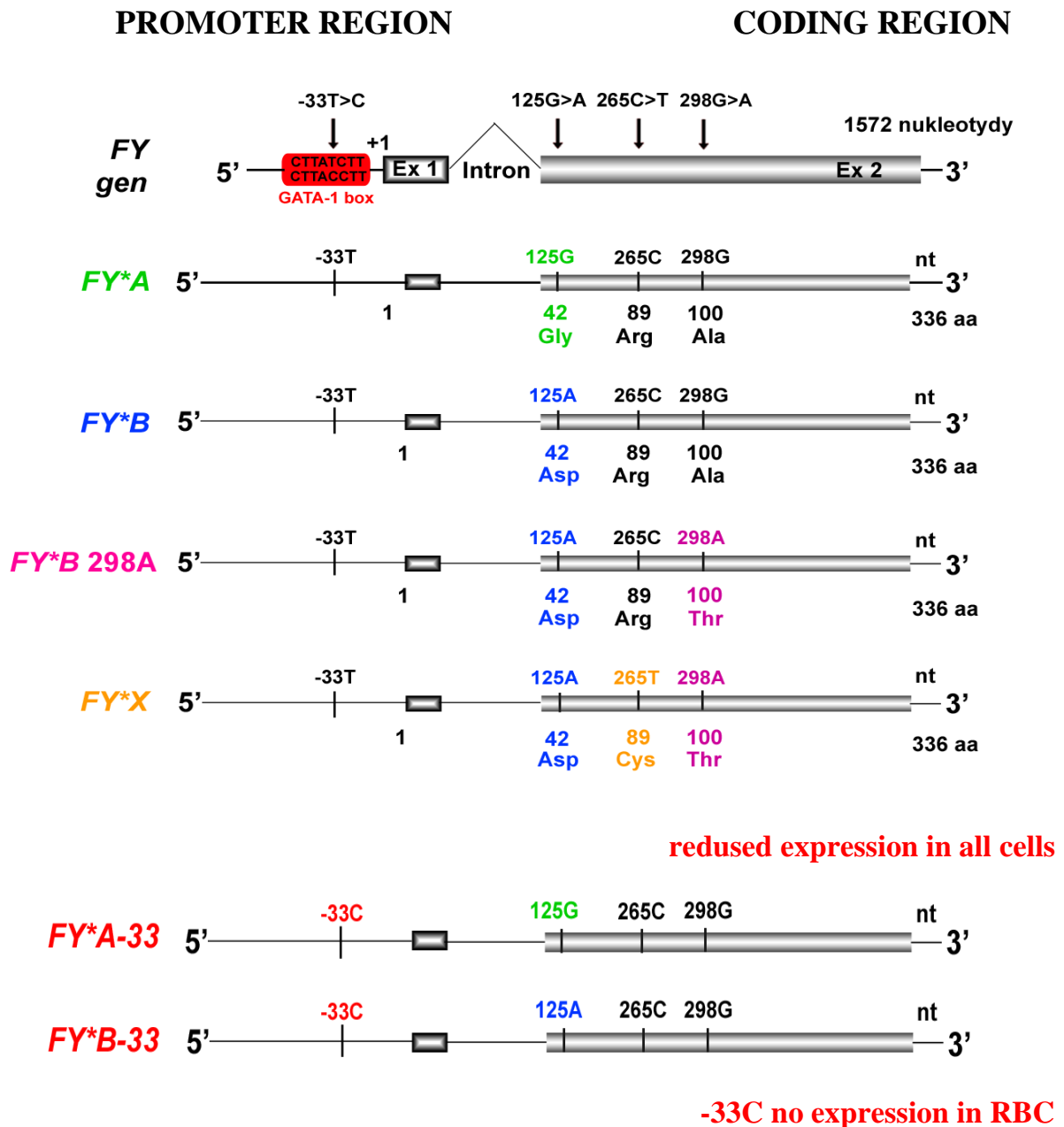
Οι γενετικές αλλαγές που βρέθηκαν σε Καυκάσιους και Ασιάτες με το φαινότυπο $Fy(a-b-)$ δεν ταυτίζονται με αυτές των ατόμων της μαύρης φυλής. Εντοπίζονται μέσα στη κωδική περιοχή των FY^*A ή FY^*B αλληλομόρφων και, όταν απαντούν σε ομοζυγωτία, ευθύνονται για την πλήρη αναστολή της έκφρασης των Duffy αντιγόνων σε όλα τα κύτταρα, ανεξαρτήτως ιστού, με αποτέλεσμα ένα πραγματικά αρνητικό φαινότυπο [35,36-38]. Εξ αιτίας αυτού, το ρίσκο αλλοανοσοποίησης σε πιθανή έκθεση σε ερυθρά που εκφράζουν Fy αντιγόνα, είναι πολύ μεγάλο [39].

Κατά τον έλεγχο τριών ατόμων εθνικοτήτων, όπως Cree Indian, Lebanese Jewish και Caucasian English, βρέθηκαν σημειακές μεταλλάξεις και στα δύο γονίδια FY^*A και FY^*B , που σχετίζονταν με κωδικόνια λήξης και επομένως πρόωρου τερματισμού της γενετικής πληροφορίας. Τα μεταλλαγμένα γονίδια, έχουν ως προϊόντα ασταθείς πολυπεπτιδικές αλυσίδες οι οποίες αποικοδομούνται. Αυτό έχει σαν συνέπεια, τα ερυθρά καθώς και τα κύτταρα των άλλων ιστών σε άτομα της Καυκάσιας φυλής με αυτές τις μεταλλάξεις και επομένως το φαινότυπο $Fy(a-b-)$, να στερούνται τις πρωτεΐνες Duffy από τη κυτταρική τους μεμβράνη [37].

Η ίδια μετάλλαξη, που αρχικά περιγράφηκε ως c.-33T>C και c.-46T>C, έχει βρεθεί και στο FY^*A αλληλόμορφο ($FY^*01N.01$), σε ετερόζυγη όμως μόνο κατάσταση και πάρα πολύ σπάνια, σε πληθυσμούς των Papua της Νέας Γουινέας και του Σουδάν [40,41]. Οι Pisacka *et al.* ανέφεραν μια καινούργια μετάλλαξη στη θέση c.1-69 του FY εκκινήτη, η οποία επίσης επηρεάζει το μοτίβο GATA και σχετίζεται με τη μη έκφραση του FY^*A αλληλίου, με αποτέλεσμα τον Fy null φαινότυπο [42].

Για τον FY γονιδιακό επίτοπο έχουν καταγραφεί και άλλα αλληλόμορφα, τα οποία μεταβάλουν το επίπεδο έκφρασης του αντιγόνου δημιουργώντας κατ' επέκταση προβλήματα στην ορολογική τυποποίηση λόγω ασθενών ή ακαθόριστων αποτελεσμάτων (**Εικόνα 3**) [39,43-45]. Οι συνηθέστερες παραλλαγές του FY γονιδίου, όπως οι c.265T>C (rs34599082) και c.298G>A (rs13962), έχουν σαν αποτέλεσμα την αντικατάσταση της αργινίνης από κυστεΐνη στη θέση 89 (p.Arg89Cys) και την αντικατάσταση της αλανίνης από θρεονίνη στη θέση 100 (p.Ala100Thr) της

γλυκοπρωτεΐνης Duffy αντίστοιχα. Οι προαναφερθείσες παραλλαγές του γονιδίου, συνήθως οδηγούν σε ασθενή έκφραση του αντιγόνου Fyb (*FY*02W.01*), που στη διεθνή βιβλιογραφία περιγράφεται ως Fyx . Πρώτος ο Chown *et al.* ανέφερε τη παρουσία του *Fy^x* γονιδίου και τη συχνότητά του στους Καυκάσιους, που δεν ξεπερνούσε το 2%.



Εικόνα 3: Schematic representation of gene structure, FY allele and Duffy glycoproteins; polymorphism sites important for each allele are marked: green for *FY*A* (Fya antigen); blue for *FY*B* (Fyb antigen); pink for *FY*B298A*; yellow for *FY*X* (Fyx antigen) and red for *FY*A-33* and *FY*B-33* (later *FY*-67*).

Łukasik E, Waśniowska K. Postepy Hig Med Dosw (Online). *Duffy blood group antigens: structure, serological properties and function*, 2016 Mar 4;70:143-61. doi: 10.5604/17322693.1196360. PMID: 26943312 Review. Polish.

Σύμφωνα με νεότερα δεδομένα, ο φαινότυπος Fyx απαντά σε Ευρωπαίους με συχνότητα που κυμαίνεται από 2 έως 3,5%, ενώ δεν συναντάται σε άτομα της Αφρικανικής φυλής [45-49]. Σημειώνεται ότι, η παραλλαγή c.298G>A δεν οδηγεί από μόνη της σε μειωμένη έκφραση του αντιγόνου Fyb [46]. Με την ασθενή έκφραση του αντιγόνου έχει συνδεθεί και μια επιπλέον μετάλλαξη, η c.145G>T στο αλληλόμορφο *FY*02W.02*, που ευθύνεται για την αλλαγή του αμινοξέος αλανίνη σε σερίνη στη θέση 49 (p.Ala49Ser) του τελικού προϊόντος [45].

Ασθενής αντιγονική δραστηριότητα έχει παρατηρηθεί και για το Fya αντιγόνο, παρότι λιγότερο συχνά, την οποία πρόσφατα μελέτησαν οι Lopez *et al.* Οι ερευνητές ταυτοποίησαν δύο παραλλαγές του *FY*A* αλληλομόρφου, τις 265T και 298A, τις οποίες εντόπιζαν σταθερά κατά τη μελέτη του φαινοτύπου αιμοδότη. Πριν τη συγκεκριμένη μελέτη, οι συγκεκριμένες παραλλαγές είχαν καταγραφεί μόνο σε συνδυασμό με το *FY*B* αλληλόμορφο. Συνοψίζοντας, το *FY*01W.02* ήταν η προσωρινή ονομασία που δόθηκε στο νέο αλληλόμορφο από την Ομάδα Εργασίας του ISBT σε θέματα Μοριακής και Γενετικής Ανοσοαιματολογίας καθώς και Ορολογίας Ομάδων Αίματος [50].

Μια πιθανή εξήγηση για τη πολυπλοκότητα των Duffy αντιγόνων θα μπορούσε να είναι η συν-έκφραση ισομορφών κάποιου εναλλακτικού *ACKR1* γονιδιακού προϊόντος σε συνδυασμό με διακριτές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ισομορφών που δρουν ως ανοσογόνα [51].

Η συσχέτιση ανάμεσα στους φαινότυπους και τους γονότυπους, όπως αυτοί προκύπτουν από τους σημαντικότερους πολυμορφισμούς, αναλύεται στο **Πίνακα 3**.

1.4 Γεωγραφική Κατανομή

Το κύριο χαρακτηριστικό του αντιγονικού συστήματος Duffy είναι οι διαφορετικές συχνότητες των αλληλομόρφων σε διαφορετικούς πληθυσμούς. Οι συχνότητες των κύριων αλληλομόρφων που μελετήθηκαν, συμπεριλήφθηκαν στα στοιχεία της τράπεζας δεδομένων του 1000 Genomes Project και παρουσιάζονται αναλυτικά στο **Πίνακα 4**.

Το 1000 Genomes Project (abbreviated as 1KGP), το οποίο ξεκίνησε τον Ιανουάριο του 2008, ήταν μια διεθνής ερευνητική προσπάθεια με στόχο την δημιουργία ενός λεπτομερέστατου καταλόγου που θα περιελάμβανε τη πλειονότητα των ανθρώπινων γενετικών πολυμορφισμών. Μέσα από αυτή τη προσπάθεια προσδιορίστηκαν

πολλές σπάνιες γενετικές παραλλαγές, που περιορίζονται σε στενά συνδεδεμένες ομάδες, και αναλύθηκαν οκτώ κατηγορίες δομικών παραλλαγών.

Πίνακας 3: Οι σημαντικότεροι πολυμορφισμοί, συσχέτιση γονοτύπων-φαινοτύπων
Gabriela Hoher, Marilu Fiegenbaum, Silvana Almeida, *Molecular basis of the Duffy blood group system, Blood Transfusion 2018; 16:93-100*

Phenotype and genotype correlations of the main polymorphisms.

Phenotype	c.125G>A ¹	c.265C>T ²	c.298G>A ³	c.1-67T>C ⁴	Predicted genotype	Predicted antigen
Fy(a+b-)	G/G	C/C	G/G	T/T	<i>FY*A/FY*A or FY*01/FY*01</i>	Fy ^a
	G/A	C/C	G/G	T/C	<i>FY*01/FY*02N.01</i>	Fy ^a /Fy ^{es}
Fy(a+b+)	G/A	C/C	G/G	T/T	<i>FY*A/FY*B or FY*01/FY*02</i>	Fy ^a /Fy ^b
	G/A	C/T	G/A	T/T	<i>FY*01/FY*02W.01</i>	Fy ^a /Fy ^x
Fy(a-b+)	A/A	C/C	G/G	T/T	<i>FY*B/FY*B or FY*02/FY*02</i>	Fy ^b
	A/A	C/T	G/A	T/T	<i>FY*02/FY*02W.01</i>	Fy ^b /Fy ^x
	A/A	T/T	A/A	T/T	<i>FY*02W.01/FY*02W.01</i>	Fy ^x
	A/A	C/T	G/A	T/C	<i>FY*02W.01/FY*02N.01</i>	Fy ^x /Fy ^{es}
	A/A	C/C	G/G	T/C	<i>FY*02/FY*02N.01</i>	Fy ^b /Fy ^{es}
Fy(a-b-)	A/A	C/C	G/G	C/C	<i>FY*02N.01/FY*02N.01</i>	Fy ^{es} /Fy ^{es}

¹rs12075 predicts the expression of the Fy^a and Fy^b antigens;

²rs34599082 determines weak expression of the Fy^b antigen;

³rs13962 determines weak expression of the Fy^b antigen;

⁴rs2814778 prevents expression of Fy^b antigen in red blood cells.

Σύμφωνα με αυτό, το αλληλόμορφο *FY*B* είναι κοινό στα άτομα της Αφρικανικής φυλής, όχι όμως της Ανατολικής Ασίας. Σύμφωνα και με στοιχεία από τα δεδομένα που συνέλεξε και η ομάδα των Howes *et al.*, το *FY*B* απαντά κυρίως στη Ευρώπη και κατά μήκος της ανατολικής πλευράς της Βόρειας και Νότιας Αμερικής με συχνότητα περίπου 50-85%. Από την άλλη, το αλληλίο *FY*A* είναι επικρατές στην Ανατολική και Νότια Ασία, την Αυστραλία καθώς και από τη Μογγολία μέχρι την Ανατολική Κίνα και Ρωσία. Σε πληθυσμούς της Αλάσκας και του Βορειοδυτικού Καναδά, η συχνότητα του αλληλίου φθάνει το 80-100%, ενώ είναι πολύ σπάνιο στους Αφρικανούς. Οι συχνότητες των αλληλομόρφων που καθορίζουν τα αντιγόνα Fy^x και Fy^{es} είναι

Πίνακας 4: Allele frequencies according to the 100 Genomes Project

Gabriela Hoher, Marilu Fiegenbaum, Silvana Almeida, *Molecular basis of the Duffy blood group system, Blood Transfusion 2018; 16:93-100*

Allele frequencies according to the 1000 Genomes Project.

dbSNP allele	AFR ¹	AMR ²	EAS ³	SAS ⁴	EUR ⁵
rs12075*G Fy(a+)	0.019	0.461	0.923	0.640	0.398
rs12075*A Fy(b+)	0.981	0.539	0.077	0.360	0.602
rs34599082*T Fy(b+ ^W) or Fy(a+ ^W)	0.000	0.007	0.001	0.004	0.013
rs13962*A Fy(b+ ^W) or Fy(a+ ^W)	0.005	0.094	0.000	0.091	0.184
rs530992295*A Fy(a ^{null})	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000
rs2814778*C Fy(b ^{null}) or Fy(a ^{null})	0.964	0.078	0.000	0.000	0.006

¹AFR: African (from Yoruba in Ibadan, Nigeria; Luhya in Webuye, Kenya; Gambian in Western Divisions in the Gambia; Mende in Sierra Leone; Esan in Nigeria; Americans of African ancestry in the SW USA; African Caribbeans in Barbados);

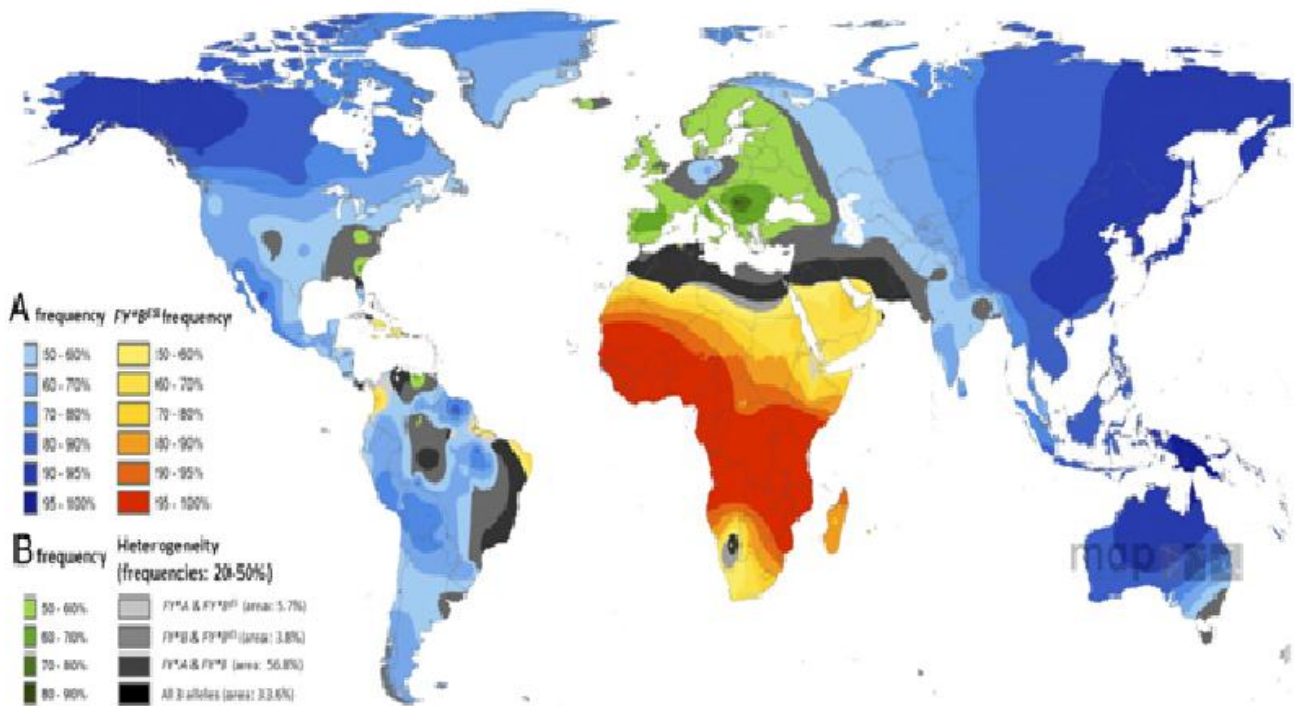
²AMR: Admixed Americans (Mexican ancestry from Los Angeles, USA; Puerto Ricans from Puerto Rico; Colombians from Medellin, Colombia; Peruvians from Lima, Peru);

³EAS: East Asian (Han Chinese in Beijing, China; Japanese in Tokyo, Japan; Southern Han Chinese; Chinese Dai in Xishuangbanna, China; Kinh in Ho Chi Minh City, Vietnam);

⁴SAS: South Asian (Gujarati Indians from Houston, Texas, USA; Punjabi from Lahore, Pakistan; Bengali from Bangladesh; Sri Lankan Tamils from the UK; Indian Telugu from the UK);

⁵EUR: European (Utah residents with northern and western European ancestry from the Centre d'Etude du Polymorphisme Humain; Tuscany in Italy; Finnish in Finland; British in England and Scotland; Iberian population in Spain).

υψηλότερες στους Ευρωπαίους και τους Αφρικανούς, αντίστοιχα. Η ανάμειξη των *FY*A* και *FY*B* εμφανίζεται συνήθως σε πληθυσμούς που προήλθαν από σχετικά πρόσφατες μεταναστεύσεις Ευρωπαϊκών πληθυσμών στη Βόρεια Αφρική και την Αμερική μετά την πολύ πρώιμη μετανάστευση πληθυσμών από την Ασία. Στο χάρτη που ακολουθεί παρουσιάζεται η παγκόσμια κατανομή των Duffy αλληλομόρφων από τους Howes *et al.*, οι οποίοι συνέλεξαν τα στοιχεία από μία βάση δεδομένων ερευνών που πραγματοποιήθηκαν από το 1950 έως το 2010 με αντικείμενο τη χαρτογράφηση των αλληλομόρφων του συστήματος Duffy (Εικόνα 4).



Εικόνα 4 - Global frequencies of the *FY* alleles.

Areas predominated by a single allele (frequency $\geq 50\%$) are represented by a color gradient (blue, FY^*A ; green, FY^*B ; red/yellow, FY^*B^{ES}). Areas of allelic heterogeneity where no single allele predominates, but two or more alleles each have frequencies $\geq 20\%$, are shown in gray-scale: palest for heterogeneity between the silent FY^*B^{ES} allele and either FY^*A or FY^*B (when coinherited, these do not generate new phenotypes), and darkest being co-occurrence of all three alleles (and correspondingly the greatest genotypic and phenotypic diversity). Overall percentage surface area of each class is listed in the legend. Refer to *SI Methods* for a methodological summary and further detail about the map surface.

Το σύστημα Duffy έχει χαρακτηριστεί ως το πιο ενδιαφέρον σχετικά με τη γονιδιακή του σύσταση για τη μελέτη και την αξιολόγηση της επίδρασης της φυσικής επιλογής σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές του πλανήτη [52,53]. Με δεδομένο ότι, η μετάλλαξη που οδηγεί σε ανθεκτικότητα στη προσβολή των ερυθροκυττάρων από το παράσιτο της ελονοσίας *P. vivax*, σχετίζεται και με τη καταστολή της έκφρασης της πρωτεΐνης DARC μόνο στα ερυθροκύτταρα, μπορούμε εύκολα να παρατηρήσουμε τις διαφορές στη συχνότητα των φαινοτύπων και των γονοτύπων του Fy^b αντιγόνου στους Αφρικανούς. Παρά το γεγονός ότι ο συχνότερος γονότυπος είναι FY^*B/FY^*B , σχεδόν όλα τα δείγματα από τέτοιους πληθυσμούς έχουν το φαινότυπο $Fy(a-b-)$ [54]. Στο **Πίνακα 5** παρουσιάζονται οι τέσσερεις πιθανοί φαινότυποι όπως αυτοί κατανέμονται στους διαφορετικούς πληθυσμούς.

Πίνακας 5: Κατανομή των 4 φαινοτύπων στις 3 εθνικότητες

Gabriela Hoher, Marilu Fiegenbaum, Silvana Almeida, *Molecular basis of the Duffy blood group system, Blood Transfusion 2018; 16:93-100*

Typical Duffy phenotype frequencies.

Phenotype	Frequencies (%)		
	Europeans	Africans	Asians
Fy(a+b-)	20	10	89,2
Fy(a-b+)	32	20	1,8
Fy(a+b+)	48	3	9,0
Fy(a-b-)	Rare	67	0

Data compiled from Mourant et al. and De Silva *et al.*

1.5 Βιοχημεία

Η Duffy γλυκοπρωτεΐνη, μία *N*-γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη που διαπερνά τη κυτταρική μεμβράνη 7 φορές, είναι ένας φαινομενικά μη λειτουργικός υποδοχέας χημειοκινών (DARC).

Οι χημειοκίνες είναι πεπτίδια μικρού μοριακού βάρους (8-14 kDa) που ο κύριος ρόλος τους είναι να προσελκύουν κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος στην περιοχή που εντοπίζεται η φλεγμονή. Συγκεκριμένα, είναι ισχυροί ενεργοποιητές και χημειοτακτικοί παράγοντες των λευκοκυττάρων. Γι αυτό το λόγο είναι απαραίτητες για την προστασία του οργανισμού. Η οικογένεια των χημειοκινών διακρίνεται σε τέσσερις ομάδες, τις CXC (όπως CXCR1 και CXCR2), CX3C, CC (CCR2), και C με βάση τη θέση των υπολειμμάτων κυστεΐνης στην αλυσίδα των αμινοξέων. Όλες οι χημειοκίνες ασκούν τις δράσεις τους μέσω της σύνδεσης τους με κατάλληλους υποδοχείς της οικογένειας των G-πρωτεϊνών οι οποίοι βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων [58].

Οι χημειοκίνες, όπως και οι περισσότερες κυτοκίνες, διαθέτουν μια πληθώρα λειτουργιών. Εκτός από τις δύο βασικές λειτουργίες, που είναι η ενεργοποίηση και η χημειοταξία των φλεγμονωδών κυττάρων στην περιοχή της φλεγμονής, μπορούν επίσης να εκτελούν και άλλες σημαντικές λειτουργίες, όπως η ρύθμιση της κυτταρικής συγκολλητικής ικανότητας, της εμβρυικής ανάπτυξης, της αγγειογένεσης, της

αιμοποίησης, της ανοσολογικής αντίδρασης, καθώς επίσης και της ρύθμισης της εισόδου των λεμφοκυττάρων και των δενδριτικών κυττάρων στη λεμφική κυκλοφορία και στους επιχώριους λεμφαδένες. Οι χημειοκίνες συμμετέχουν επιπλέον σε μία σειρά από παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι τα αυτοάνοσα νοσήματα, η αλλεργική αντίδραση, η καρκινογένεση, η μετάσταση, καθώς επίσης και σε κάποιες ειδικές λοιμώξεις όπως είναι η λοίμωξη από τον ιό HIV-1 και από το Plasmodium vivax. Τα τελευταία χρόνια έχει βρεθεί ότι οι λοιμώξεις αυτές χρησιμοποιούν τους υποδοχείς των χημειοκινών ως σημεία-στόχους κυτταρικής εισόδου στον οργανισμό [59].

Η πρωτεΐνη DARC συνδέεται με χημειοκίνες που ανήκουν στις κλάσεις CXC και CC [55-57]. Παραδείγματα των CXC χημειοκινών αποτελούν η ιντερλευκίνη-8 (IL-8) και ο παράγοντας MGSA (melanoma growth stimulatory activity), ενώ οι CC χημειοκίνες περιλαμβάνουν τις RANTES (regulated on activation, normal T expressed and secreted) και MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) [55-57] (Εικόνα 5)

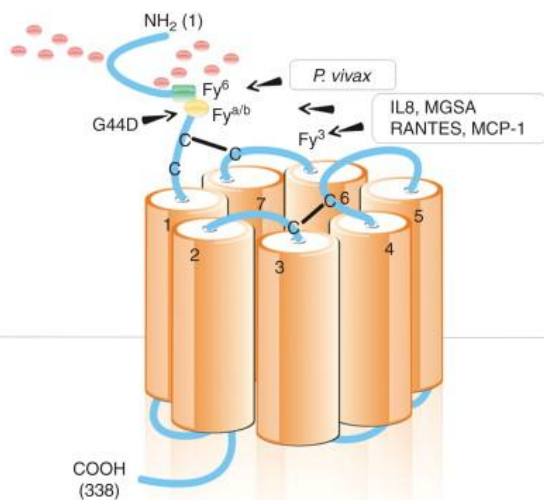
Η ακριβής λειτουργία των DARC πρωτεϊνών δεν έχει ακόμα πλήρως καθοριστεί. Έχει όμως περιγραφεί, ως κύρια φυσιολογική λειτουργία της, η ιδιότητά της να διατηρεί τα ομοιοστατικά επίπεδα των κυκλοφορούντων χημειοκινών και να ρυθμίζει τη διαβάθμισή τους μεταξύ των ιστών και του αίματος με στόχο την εισροή ουδετερόφιλων από τα αιμοφόρα αγγεία στους ιστούς κατά τη διάρκεια της ανοσοαπόκρισης [63,64].

Σύμφωνα επίσης και με μία επικρατούσα υπόθεση, οι DARC πιθανά επιτρέπουν στο ερυθροκύτταρο να λειτουργεί ως «νεροχύτης» χημειοκινών ή καθαριστής, καταστέλλοντας έτσι την ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων στη συστηματική κυκλοφορία. Πάντως, δεν είναι απόλυτα γνωστό για πόσο διάστημα οι χημειοκίνες παραμένουν προσδεμένες στη κυτταρική επιφάνεια ή τι συμβαίνει με αυτές στο τέλος ζωής του ερυθροκυττάρου. Επιπρόσθετα, δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί η σημαντικότητα αυτής της λειτουργίας στη φλεγμονή ή σε λοίμωξη καθώς τα Fy(a-b-) ερυθροκύτταρα δεν συνδέουν χημειοκίνες, ενώ τα Fy(a-b^w) ερυθροκύτταρα φαίνεται να συνδέουν χαμηλά επίπεδα χημειοκινών συγκριτικά με τα Fy(a-b+) [60-62].

Παρόλο που οι ακριβείς μηχανισμοί δράσης της πρωτεΐνης DARC δεν έχουν ακόμα αποσαφηνιστεί, όπως προαναφέρθηκε, η μελέτη της, ως εργαλείο κατανόησης των πληθυσμιακά σχετιζόμενων διαφορών στη πιθανότητα νόσησης [65], παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, όπως αποδεικνύεται από έρευνα σε εξέλιξη, για το ρόλο της στη παθολογία που σχετίζεται με τη φλεγμονή και τη κακοήθεια [65,66], καθώς και από το πρόσφατο, αν και εξαιρετικά αμφιλεγόμενο, μεγάλο κύμα ενδιαφέροντος σχετικά με το ρόλο της στη λοίμωξη από τον ιό HIV.

Έχει προταθεί ότι ο ρόλος της DARC στην HIV/AIDS λοίμωξη σχετίζεται με τη μεσολάβησή της στη σύνδεση του ιού στα ερυθρά και τη μετέπειτα μεταφορά του στα κύτταρα στόχους. Από την άλλη, έχει διαπιστωθεί ότι κάποιες μεταλλάξεις της DARC καταργούν την έκφραση του υποδοχέα, οδηγώντας σε σημαντικά αυξημένη ευαισθησία στη λοίμωξη από τον ιό αλλά, παραδόξως, και σε παρατεταμένο χρόνο επιβίωσης των προσβεβλημένων ατόμων. Άλλες μελέτες, έχουν δείξει ότι ο HIV-1 προσδένεται στην ερυθροκυτταρική DARC, δίνοντας τη δυνατότητα σε αυτά τα ερυθρά να μεταδίδουν τον HIV στα μονοπύρηνια κύτταρα του περιφερικού αίματος. Έτσι, τα κύτταρα αυτά φαίνεται να λειτουργούν ως αποθήκες του HIV-1 ή σαν μέσο εισόδου του ιού στα CD4, στους νευρώνες ή τα ενδοθηλιακά κύτταρα [67].

Η πρωτεΐνη DARC επίσης σχετίζεται κλινικά με ασθένειες όπως το άσθμα και η ατοπία σε κάποιους πληθυσμούς Αφρικανικής καταγωγής, η ωοκυττάρωση (ovalocytosis) σε πληθυσμούς της Νοτιοανατολικής Ασίας καθώς και άλλες ασθένειες που σχετίζονται με φλεγμονή. Εξαιρετικής όμως σημασίας αποτελεί ο ρόλος της DARC ως δίοδος των παρασίτων της ελονοσίας στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα [29].



Εικόνα 5. Glycoprotein Duffy: functions.

Adapted from Mallinson G, Soo KS, Schall TJ, Pisacka M, and Anstee DJ (1995)

2. ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ

Το αντίσωμα anti-Fya ανιχνεύεται στον ορό κυρίως μετά από μετάγγιση, λιγότερο συχνά από εγκυμοσύνη και σχεδόν ποτέ δεν ανιχνεύεται ως φυσικό αντίσωμα [97]. Το αντίσωμα anti-Fyb ανιχνεύεται έως και 20 φορές πιο σπάνια από το anti-Fya και

σχεδόν πάντα μαζί και με άλλα αντισώματα [98]. Τα συγκεκριμένα αντισώματα ανήκουν κατά πλειονότητα στη IgG1 υποκλάση και πού λιγότερο στις υποκλάσεις IgG2(18%) και IgM(25%) [99]. Και τα δύο είδη αντισωμάτων προκαλούν άμεσες και καθυστερημένες αιμολυτικές αντιδράσεις μετά από μετάγγιση [1,100].

Τα αντιγόνα Fya και Fyb εκφράζονται σε ερυθροειδικά και μη-ερυθροειδικά κύτταρα, όπως τα ενδοθηλιακά και τα επιθηλιακά κύτταρα ποικίλων οργάνων όπως ο εγκέφαλος, τα νεφρά, ο σπλήνας, η καρδιά, οι πνεύμονες, το πάγκρεας και ο πλακούντας. Λόγω αυτού, τα αντιγόνα Duffy αποκτούν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις, στην απόρριψη μοσχεύματος και πιθανά στην ιστοσυμβατότητα.

Εν κατακλείδι, το αντιγονικό σύστημα Duffy είναι ένα πολυμορφικό σύστημα το οποίο θέτει μία τεράστια πρόκληση για τους ερευνητές τόσο σε επίπεδο φαινοτύπου και γονοτύπου όσο και επίπεδο ιστών [79].

2.1 DARC και Malaria

Επιπλέον της λειτουργίας της ως υποδοχέας των χημειοκινών, η Duffy γλυκοπρωτεΐνη λειτουργεί και ως ερυθροκυτταρικός υποδοχέας για το *Plasmodium vivax* και το *Plasmodium knowlesi*. Αρχικά το *P. knowlesi*, ένα παράσιτο ελονοσίας που προσβάλλει τους πιθήκους, χρησιμοποιήθηκε ως ένα in vitro μοντέλο στις μελέτες για το παράσιτο της ελονοσίας που προσβάλλει τον άνθρωπο. Οι Miller *et al* [29] πραγματοποίησαν τυποποίηση φαινοτύπου σε 11 εθελοντές, οι οποίοι είχαν εκτεθεί σε κουνούπια μολυσμένα με το παράσιτο *P.vivax* και διαπίστωσαν ότι μολύνθηκαν από ελονοσία όσοι από αυτούς ήταν Fy(a+) ή Fy(b+), ενώ δεν προσβλήθηκαν από το παράσιτο τα ερυθρά όσων ήταν Fy(a-b-).

Όλα τα στοιχεία έκτοτε απέδειξαν ότι ο υποδοχέας PvDbp (*P.vivax* Duffy-binding protein) στην κυτταρική επιφάνεια του παράσιτου, αλληλεπιδρά με τα αντιγόνα Duffy που βρίσκονται στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων, επιτρέποντας έτσι τη μόλυνσή τους από το παράσιτο. Με αυτό το δεδομένο, η πρωτεΐνη PvDbp θα μπορούσε να θέσει υποψηφιότητα στην έρευνα για την ανάπτυξη εμβολίου [69].

Αντίθετα με το *Plasmodium falciparum*, που χρησιμοποιεί πλειάδα υποδοχέων της επιφάνειας των ανθρώπινων ερυθροκυττάρων ώστε να τα προσβάλουν, τα *Plasmodium vivax* και *Plasmodium knowlesi* χρησιμοποιούν αποκλειστικά τα αντιγόνα του συστήματος Duffy, με αποτέλεσμα, ερυθροκύτταρα που στερούνται των συγκεκριμένων αντιγόνων να είναι ανθεκτικά στη προσβολή από τους μεροζώιτες [29, 70-71].

Η ελονοσία που οφείλεται στο *P.vivax* είναι η πιο διαδεδομένη παγκοσμίως, με καταγεγραμμένες 70 με 80 εκατομμύρια περίπου κρούσματα ανά έτος [72]. Άτομα με το φαινότυπο Fy(a-b-) έχουν ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα καθότι τα ερυθρά τους ανθίστανται στη προσβολή από το πλασμάδιο. Είναι γεγονός ότι στη Δυτική Αφρική όπου δεν ενδημεί το *P.vivax*, το 95% του πληθυσμού της έχουν ερυθροκυτταρικό φαινότυπο Fy(a-b-). Το κενό επομένως στη διασπορά του *P. vivax* στην Αφρική, φαίνεται να είναι η συνέπεια της απουσίας των Duffy αντιγόνων από τα ερυθροκύτταρα, προτείνοντας δύο πιθανές αιτίες: είτε μια προσαρμοσμένη απάντηση στην ασθένεια, είτε μια επιλεκτική πίεση που ασκείται στο παράσιτο [73,74]. Επιπλέον έχει περιγραφεί ένα δοσοεξαρτώμενο φαινόμενο που αφορά τη, εξαρτώμενη από το γονότυπο, ποσότητα της εκφραζόμενης πρωτεΐνης DARC, και σχετίζεται με τη δεκτικότητα ή την αντίσταση στη λοίμωξη [40,75-77].

Ωστόσο κάποιες αντιφάσεις που αφορούν υποθέσεις σχετικά με τη γενετική προσαρμογή πρέπει να διευκρινιστούν, όπως στη περίπτωση της Νοτιοανατολικής Ασίας, μιας ακόμα ενδημικής περιοχής του *P.vivax*, όπου ο φαινότυπος Fy(a-b-) δεν είναι κοινός και η λοίμωξη από το πλασμάδιο δεν είναι θανατηφόρα [17,72].

Από τα παραπάνω συνεπάγεται ότι τα ερυθροκύτταρα των ετεροζυγωτών για το σιωπηλό αλληλίο δεσμεύουν σημαντικά λιγότερο σύμπλοκο *P.vivax*-Duffy binding protein από αυτούς που φέρουν και τα δύο ενεργά *FY* αλληλόμορφα. Αυτό δείχνει ότι η Duffy-negative ετεροζυγωτία προσδίδει σημαντική προστασία και μπορεί να έχει ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα σε περιοχές όπου ενδημεί το *P.vivax* [78].

Ωστόσο, από το 2006 έχουν καταγραφεί περιπτώσεις Duffy-αρνητικών ατόμων που έχουν μολυνθεί από το *P.vivax* και στην Αφρικανική ήπειρο (Kenya, Madagascar, Mauritania, Cameroon, Angola, Equatorial Guinea, Ethiopia, Sudan) και στον Αμαζόνιο της Βραζιλίας [79]. Οι μηχανισμοί που χρησιμοποιούν τα παράσιτα για την εισβολή τους στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα απαιτούν περαιτέρω διευκρίνιση: Οι υποθέσεις που διατυπώνονται περιλαμβάνουν επεκτάσεις του γονιδίου του *P.vivax* που κωδικοποιεί τη πρωτεΐνη πρόσδεσης με τα αντιγόνα Duffy [80], καθώς και τη χρήση εναλλακτικών σημείων πρόσδεσης [73,80].

2.2 DARC και Νεφρική Ανεπάρκεια

Στην υπόθεση ότι η πρωτεΐνη Duffy, ACKR1, στα ερυθρά αιμοσφαίρια λειτουργεί ως υποδοχέας εκκαθάρισης μεσολαβητών της φλεγμονής, συμμετέχοντας στη προσπάθεια του οργανισμού να την καταστείλει, δημιουργείται το ερώτημα τι ρόλο θα μπορούσαν οι ACKR1 να παίζουν στη ρύθμιση μιας ανοσιακής απάντησης σε περιπτώσεις νεφρικής νόσου και μεταμόσχευσης νεφρού. Οι Liu *et al.*,

χρησιμοποιώντας ένα anti-Fy^b μονοκλωνικό αντίσωμα, πραγματοποίησαν μελέτες με τεχνικές ανοσοϊστοχημίας σε βιοψίες νεφρού παιδιών με νεφρική νόσο με σκοπό να εξετάσουν την έκφραση των αντιγόνων Duffy. Η έκφραση των DARC στα νεφρικά κύτταρα φάνηκε να είναι αυξημένη σε πολλαπλές αιτίες κυτταρικής βλάβης, συμπεριλαμβανομένων της HIV Νεφροπάθειας και του Ουραιμικού Αιμολυτικού Συνδρόμου. Οι συγγραφείς έκαναν την υπόθεση ότι αυτή η αυξημένη έκφραση των DARC πρωτεϊνών μπορεί να σχετίζεται με μια προσπάθεια του νεφρού να απορροφήσει και να εξουδετερώσει τις χημειοκίνες κι έτσι να ελέγξει τη φλεγμονή. Αυτό, σύμφωνα με τους συγγραφείς, μπορεί πιθανά να συσχετίσει τα υψηλά ποσοστά της HIV Νεφροπάθειας στα άτομα της μαύρης φυλής που χαρακτηρίζονται από τον Fy(a-b-) φαινότυπο [81].

Άλλες ερευνητικές ομάδες προσπάθησαν στις μελέτες τους να βρουν μία σχέση ανάμεσα στην έκφραση των Duffy αντιγόνων και την επιβίωση των νεφρικών μοσχευμάτων, χωρίς όμως αποτέλεσμα. Οι Akalin και Neylan βρήκαν ότι Duffy-αρνητικοί δέκτες μοσχεύματος είχαν χαμηλότερη επιβίωση αλλομοσχεύματος σε σύγκριση με δέκτες διαφορετικού φαινοτύπου και οδηγήθηκαν στην υπόθεση ότι η απώλεια της ικανότητας πρόσδεσης χημειοκινών κάνει τους Duffy-αρνητικούς δέκτες πιο ευπαθείς στη κακή λειτουργία του μοσχεύματος. Οι Mange *et al.* δεν επιβεβαίωσαν κάποια σχέση ανάμεσα σε δέκτη μοσχεύματος με φαινότυπο DARC null και την αυξημένη επίπτωση οξείας απόρριψης νεφρικού αλλομοσχεύματος ή καθυστερημένης λειτουργίας του μοσχεύματος. Μία σχετικά πρόσφατη δημοσίευση που αφορά την έρευνα περιπτώσεων ασυμβατότητας μεταξύ δέκτη και δότη νεφρικού μοσχεύματος, προτείνει τη πιθανή συμμετοχή των αντιγόνων Duffy στο ελάσσων σύστημα ιστοσυμβατότητας [80].

3. ANΤΙΣΩΜΑΤΑ DUFFY

3.1 Anti-Fy^a, -Fy^b

Αντισώματα έναντι των αντιγόνων των συστήματος Duffy ανιχνεύονται μετά από μετάγγιση και, λιγότερο συχνά, μετά από εγκυμοσύνη. Σπάνια απαντούν ως φυσικά αντισώματα. Ανήκουν στην υποκατηγορία των IgG1 αντισωμάτων και το 50% αυτών συνδέουν το συμπλήρωμα. Ειδικότερα, το anti-Fy^b, το οποίο ανιχνεύεται περίπου κατά 20 φορές λιγότερο συχνά από το anti-Fy^a, είναι συνήθως παρόν στον ορό μαζί και με άλλα αλλοαντισώματα [1,82]. Και τα δύο αντισώματα προκαλούν οξείες αλλά και επιβραδυνόμενες αιμολυτικές αντιδράσεις. Στην Αφρικανική φυλή, τα αντισώματα

που ανιχνεύονται είναι τα anti-Fy^a, καθότι δεν παράγουν anti-Fy^b, και επιπλέον τα anti-Fy3 και anti-Fy5 [83,84].

Σχετικά με την Αιμολυτική Νόσο Εμβρύου και Νεογνού (HDFN), αντισώματα anti-Fy^a ανιχνεύθηκαν σε ποσοστό 5.4% των άτυπων αλλοαντισωμάτων σε ομάδα γυναικών υπό μαιευτική νοσηλεία σε κέντρο τριτοβάθμιας περίθαλψης. Αντιθέτως, αντισώματα anti-Fy^b ανιχνεύθηκαν σε πολύ μικρό ποσοστό, από 0.5%-3.1%, σύμφωνα και με δεδομένα άλλων μαιευτικών κλινικών [85].

Οι Hughes *et al.* [86] σε ανασκόπησή τους, περιγράφουν τα κλινικά αποτελέσματα από μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 18 γυναίκες σε κύηση μεταξύ των ετών 1959 και 2004, στις οποίες το μοναδικό αλλοαντίσωμα που ανιχνεύθηκε ήταν anti-Fy^a, καθώς διαπιστώθηκε ότι το έμβρυο ήταν Fy(a+). Σημαντικής βαρύτητας Αιμολυτική Νόσος (HDFN) σημειώθηκε στις 2 από τις 18 κυήσεις (11%), η οποία αντιμετωπίστηκε με αφαιμαξομετάγγιση ή ενδομήτρια μετάγγιση. Δεν καταγράφηκε ύδρωπας ή θάνατος σχετιζόμενος με την αιμόλυση. Αναφέρθηκε επίσης μία μεμονωμένη περίπτωση HDFN που προκλήθηκε από αντίσωμα anti-Fy^b [87].

3.2 Anti-Fy3, -Fy4, -Fy5, και -Fy6

Το αντίσωμα anti-Fy3 περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Albrey *et al.*[88] σε Καυκάσια γυναίκα που ήταν σε κύηση στο τρίτο της παιδί. Οι συγγραφείς σημείωσαν ότι η αντιδραστικότητα αυτού του αντισώματος «δείχνει ότι το σύστημα Duffy είναι περισσότερο πολύπλοκο από ότι πίστευαν πριν». Το αντίσωμα anti-Fy3 φάνηκε να είναι μοναδικό στην ικανότητά του να αντιδρά με επεξεργασμένα με ένζυμο Fy(a+) ή Fy(b+) ερυθρά και να μην αντιδρά με Fy(a-b-) ερυθρά από άτομα της Αφρικανικής φυλής. Κλινικά, το νεογνό εκδήλωσε μία ήπια Αιμολυτική Νόσο (HDFN), με ασθενώς θετική άμεση δοκιμασία αντισφαιρινικού ορού, χωρίς όμως να απαιτηθεί κάποιο είδος θεραπείας.

Επόμενες αναφορές που έγιναν για το αντίσωμα anti-Fy3, αφορούσαν άτομα της μαύρης φυλής που εξετάστηκαν λόγω εκδήλωσης οξείας ή επιβραδυνόμενης αιμολυτικής αντίδρασης μετά από μετάγγιση [83,89,90]. Οι Vengelen-Tyler διαπίστωσαν ότι αντισώματα anti-Fy3 αναπτύχθηκαν μετά τα anti-Fy^a αντισώματα που αναπτύχθηκαν σε άτομα με Δρεπανοκυτταρική Νόσο που πήραν πολλαπλές μεταγγίσεις ερυθρών, ενώ οι Olteanu *et al.*[89] ανέφεραν μία περίπτωση οξείας αιμολυτικής αντίδρασης μετά από μετάγγιση, που αφορούσε άτομο ηλικίας 8 ετών, της μαύρης φυλής, υπό χειρουργική αποκατάσταση διαυγενικού κατάγματος μηριαίου οστού και οφειλόταν αποκλειστικά στην ανάπτυξη anti-Fy3 αντισώματος.

Η μοναδική περίπτωση ανάπτυξης anti-F4y⁴ αντισώματος περιγράφηκε από τους Behzad *et al.*[91] σε άτομο ηλικίας 12 ετών με δρεπανοκυτταρική νόσο. Το αντίσωμα αυτό φάνηκε να αντιδρά με Fy(a-b-) ερυθρά, μερικώς με Fy(a+b-) ή Fy(a-b+) ερυθρά και καθόλου με Fy(a-b+). Εν κατακλείδι, η ύπαρξη του συγκεκριμένου αντισώματος αμφισβητείται εξ αιτίας τόσο της έλλειψης σταθερών αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων όσο και της έλλειψης σταθερότητας του δείγματος κατά τη διάρκεια αποθήκευσης και μεταφοράς του.

Οι Colledge *et al.*[92] ανέφεραν το πρώτο παράδειγμα ανάπτυξης του αντισώματος anti-Fy5, που αφορούσε άτομο ηλικίας 11 ετών, της μαύρης φυλής, με φαινότυπο Fy(a-b-), το οποίο κατέληξε λόγω οξείας λευχαιμίας, αμέσως μετά την ανακάλυψη του αντισώματος. Όμοια με το αντίσωμα anti-Fy3, το anti-Fy5 φάνηκε να αντιδρά με επεξεργασμένα με ένζυμο Fy(a+) ή Fy(b+) ερυθρά και να μην αντιδρά καθόλου με Fy(a-b-) ερυθρά από άτομα της Αφρικανικής φυλής ή Rhnull κύτταρα με φυσιολογική έκφραση των Fy^a και Fy^b αντιγόνων. Μία ακόμα θετική αντίδραση καταγράφηκε με Fy(a-b-) ερυθρά ατόμου της Καυκάσιας φυλής. Το συγκεκριμένο αντίσωμα ενοχοποιείται για την εκδήλωση επιβραδυνόμενης αιμολυτικής αντίδρασης σε άτομα με δρεπανοκυτταρική νόσο, τα οποία αναπτύσσουν αυτό το αντίσωμα σε συνδυασμό και με άλλα σημαντικά αντισώματα, όπως anti-Fya [83,93], -K, -E και -C [94].

Αντίσωμα anti-Fy6 δεν έχει ανιχνευθεί σε άνθρωπο. Στον τομέα των διαγνωστικών τεστ έχουν αναπτυχθεί μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των Fy6 επιτόπων, καθώς και έναντι άλλων επιτόπων του συστήματος Duffy [95].

4. ΑΝΟΣΟΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

Η ανίχνευση των ερυθροκυτταρικών αντιγόνων είναι πρωτίστης σημασίας στη πρακτική των μεταγγίσεων με σκοπό την αποφυγή της ανάπτυξης αλλοαντισωμάτων, ειδικά σε πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς. Τα αντισώματα που αναπτύσσονται έναντι των ερυθροκυτταρικών αντιγόνων είναι ένα πρόβλημα μεγάλης κλινικής σημασίας στο πεδίο των μεταγγίσεων καθότι μπορούν να οδηγήσουν σε οξείες αιμολυτικές αντιδράσεις καθώς και σε αιμολυτική νόσο εμβρύου και νεογνού, ανεβάζοντας έτσι το δείκτη θνητότητας και θνησιμότητας των ασθενών. Επιπρόσθετα, η ανάπτυξη αλλοαντισωμάτων δυσκολεύει και καθυστερεί την ανεύρεση συμβατού αίματος. Η πιθανότητα ενός μεταγγιζόμενου ασθενούς να αναπτύξει ένα ή περισσότερα αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα αγγίζει το 1% ανά μεταγγιζόμενη μονάδα, ενώ σε πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς μπορεί να φθάσει και το 50% [96].

Τα συστήματα ομάδων αίματος χαρακτηρίζονται από την παρουσία ή την απουσία των ερυθροκυτταρικών αντιγόνων στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων. Προς το παρόν, σύμφωνα με τη Διεθνή Κοινότητα Μεταγγισιοθεραπείας (ISBT), έχουν ταυτοποιηθεί 346 ερυθροκυτταρικά αντιγόνα, που κατανέμονται σε 36 διαφορετικά αντιγονικά συστήματα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η μεταγγισιακή πρακτική που εφαρμόζεται σήμερα συχνά απαιτεί εκτός από τη συμβατότητα ως προς τα συστήματα ABO και Rh, να λαμβάνεται υπόψη η συμβατότητα και ως προς άλλα αντιγονικά συστήματα, όπως τα C,c,E,e καθώς και τα Kell, Kidd, Duffy, MNS[96].

Μέχρι σήμερα είναι γνωστές και εφαρμόζονται διάφορες τεχνικές ορολογικής τυποποίησης ερυθροκυτταρικών αντιγόνων. Οι κλασσικές μέθοδοι περιλαμβάνουν δοκιμασίες αιμοσυγκόλλησης, οι οποίες ανιχνεύουν το αντιγόνο μετά από πρόσδεσή του με τους ειδικούς γι αυτό αντιορούς, προκαλώντας κατ' επέκταση και τη συγκόλληση των ερυθρών, δίνοντας ορατό αποτέλεσμα. Εφαρμόζονται με επιτυχία στον καθημερινό έλεγχο ρουτίνας, αλλά η δυσκολία ανεύρεσης αντιορών για τα σπάνια αντιγόνα τις καθιστά σε ειδικές περιπτώσεις ανεπαρκείς. Ανεπαρκείς ή αναξιόπιστες μπορεί να αποδειχθούν επίσης, στις περιπτώσεις χαμηλής έκφρασης κάποιου αντιγόνου στην επιφάνεια του ερυθροκυττάρου, σε πρόσφατες μεταγγίσεις <3 μηνών, καθώς και σε συγκεκριμένες παθολογικές καταστάσεις, όπως η Αυτοάνοση Αιμολυτική Αναιμία και η Απλαστική Αναιμία.

5. ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ

Η πρόοδος που έχει επιτευχθεί μέχρι σήμερα στο τομέα της Μοριακής Βιολογίας έκανε δυνατή την ανάπτυξη και εφαρμογή νέων μεθοδολογιών με στόχο την αύξηση της ασφάλειας των μεταγγίσεων (**Εικόνα 6**). Η μοριακή ανάλυση του ερυθροκυτταρικού φαινοτύπου έχει αποδειχθεί αποδοτική και προνομιούχα σε σχέση με την απλή ορολογική φαινοτύπηση σε αρκετές περιπτώσεις, καθότι παρέχει το μέσο για τη πρόβλεψη του φαινοτύπου μέσω ανάλυσης του γονοτύπου με υψηλή ακρίβεια. Έχουν περιγραφεί ποικίλες εφαρμογές της μοριακής τυποποίησης ερυθροκυτταρικών αντιγόνων, μερικές από τις οποίες αφορούν τη μοριακή τυποποίηση εμβρυϊκού DNA, το καθορισμό ομάδων αίματος πρόσφατα μεταγγισμένου ασθενούς, τη δημιουργία τράπεζας σπανίων δοτών, το καθορισμό της συχνότητας πολυμορφισμών σε ένα πληθυσμό, τη τυποποίηση ασθενών με Αυτοάνοση Αιμολυτική Αναιμία καθώς και την εκτεταμένη τυποποίηση μονάδων που προορίζονται για αλλοανοσοποιημένους ασθενείς με πολλαπλά αντισώματα [68,96].

Η μοριακή τυποποίηση του συστήματος Duffy μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό συμπληρωματικό εργαλείο στην ήδη εφαρμοζόμενη ορολογική τυποποίηση, ειδικά σε κλινικής σημασίας περιπτώσεις, όπως η πιθανότητα εκδήλωσης HDFN ή η εύρεση απόλυτα συμβατού αίματος για πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς. Οι Goodrick *et al.* [101] σημείωσαν ότι, παρόλο που τα anti-Fya αντισώματα σπάνια προκαλούν σοβαρό HDFN, η δυνατότητα να πραγματοποιείται μοριακή τυποποίηση σε εμβρυϊκό δείγμα, αποτελεί μεγάλο όφελος στη περίπτωση που ο πατέρας είναι ετερόζυγος για *FY*A*. Συχνά μεταγγιζόμενοι ασθενείς, όπως οι ασθενείς με δρεπανοκυτταρική νόσο, όπως και κάθε ασθενής που έχει αναπτύξει ένα τουλάχιστον αλλοαντίσωμα, βρίσκονται σε υψηλότερο κίνδυνο να αναπτύξουν πολλαπλά αλλοαντισώματα [102]. Επιπλέον, η μοριακή τυποποίηση του συστήματος Duffy μπορεί να βοηθήσει αποτελεσματικά στην ανεύρεση συμβατού αίματος διευκρινίζοντας ποιοί ασθενείς με φαινότυπο Fy(a-b-) φέρουν την GATA-1 μετάλλαξη στη περιοχή του εκκινητή του γονιδίου *FY*B*, καθώς είναι δυνατό να μεταγγιστούν με Fy(b+) αίμα χωρίς το ρίσκο να αναπτύξουν anti-Fyb ή anti-Fy3 [103].

Καθώς η μοριακή βάση των περισσότερων ερυθροκυτταρικών αντιγόνων είναι πια γνωστή, πολυάριθμες μέθοδοι ανάλυσης DNA έχουν αναπτυχθεί, όλες βασισμένες στη τεχνική PCR. Οι απλές νουκλεοτιδικές αλλαγές (SNPs) μπορούν να ανιχνευθούν με αρκετές από αυτές τις μεθόδους, όπως η SSP-PCR (sequence-specific primer PCR), η PCR-RFLP που χρησιμοποιεί περιοριστικά ένζυμα και η real-time PCR που βασίζεται στην ειδική επέκταση αλληλομόρφου και ανάλυση της αλληλουχίας.

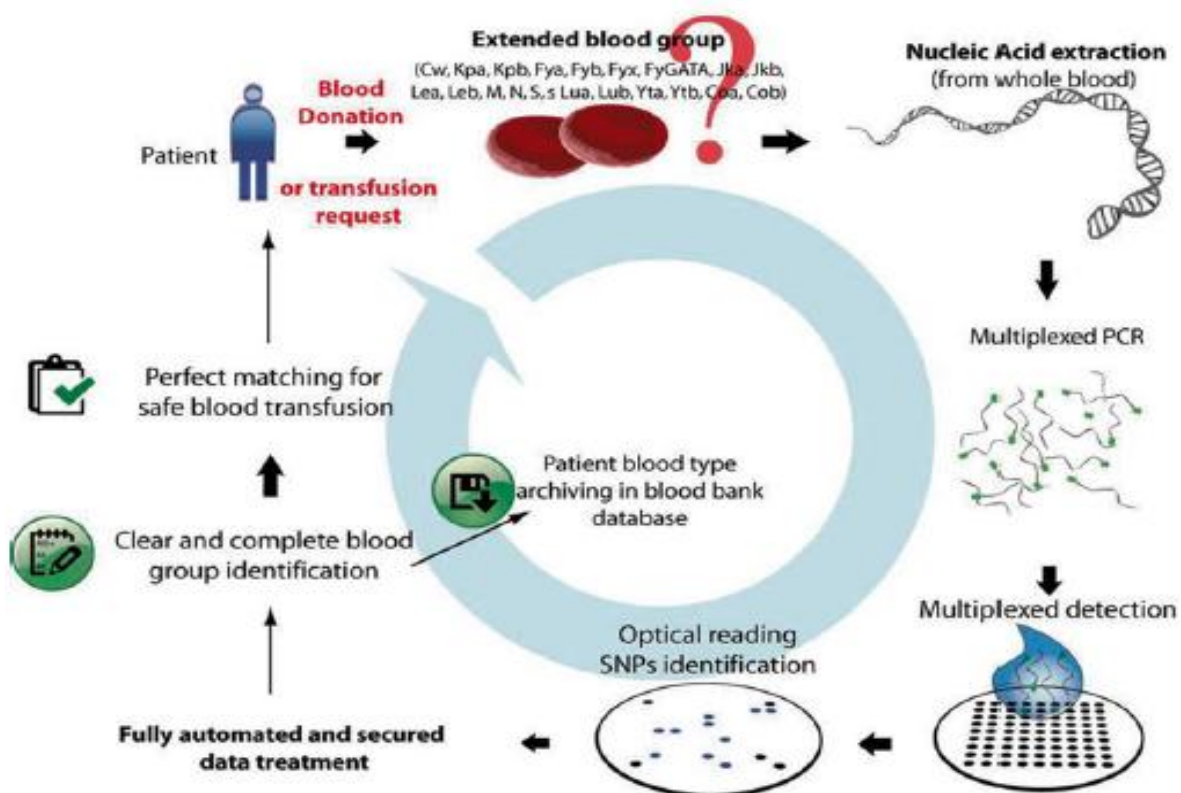
Μία εξελιγμένη και σύγχρονη τεχνική που να μπορεί να ανιχνεύει ταυτόχρονα και σε μεγάλη κλίμακα, πολλούς και διαφορετικούς πολυμορφισμούς αποτελεί η ανάλυση DNA με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών (microarray genotyping). Η συγκεκριμένη τεχνική περιγράφηκε πρώτη φορά το 1989 για μοριακή τυποποίηση ερυθροκυτταρικών αντιγόνων ομάδων αίματος και αργότερα για τη τυποποίηση των αντιγόνων των αιμοπεταλίων από τους Hashmi *et al.*. Η συμβολή της στη βελτίωση της μεταγγισιοθεραπευτικής πρακτικής, και κατ' επέκταση της ασφάλειας των μεταγγίσεων, είναι πολύ σημαντική καθότι βοηθά στην υπερκάλυψη των περιορισμών που χαρακτηρίζουν τις ορολογικές μεθόδους, αντικαθιστώντας τα ανοσοχημικά αντιδραστήρια με συνθετικά και προτυποποιημένους ανιχνευτές [104]

Για τη μοριακή τυποποίηση του συστήματος Duffy χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο τελευταίας γενιάς **BioArray BeadChip** (PreciseType HEA Molecular BeadChip Test) της εταιρείας **Immucor Medizinische Diagnostik GmbH**. Η συγκεκριμένη, υψηλής απόδοσης, μέθοδος μπορεί να ανιχνεύει μια μεγάλη γκάμα πολυμορφισμών που οφείλονται σε απλές νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις οι οποίες επηρεάζουν την

αντιγονική έκφραση. Χρησιμοποιεί τη τεχνολογία **Elongation-mediated Multiplexed Analysis of Polymorphisms (eMAP)** για να αναγνωρίσει τη παρουσία ή απουσία επιλεγμένων πολυμορφισμών που συνδέονται με συγκεκριμένο φαινότυπο (**Εικόνα 6**).

Το BioArray HEA BeadChip Kit ανιχνεύει σε μία εφαρμογή 24 ερυθροκυτταρικούς πολυμορφισμούς οι οποίοι συνδέονται με 35 αντιγόνα από 11 αντιγονικά συστήματα μεγάλης κλινικής σημασίας. Μεταλλαγές που είναι γνωστό ότι οδηγούν σε σίγαση (καμία έκφραση) των αντιγόνων Duffy (Fyb) [FY2] και MNS (S) [MNS3] έχουν ενσωματωθεί στη μέθοδο καθώς και η μετάλλαξη που προσδιορίζει τη κατάσταση της αιμοσφαιρίνης S.

Η μέθοδος, έχει πάρει έγκριση από τον FDA για την εφαρμογή της σε IVD-diagnostics στις ΗΠΑ, και CE-mark για τη χρήση της στην Ευρώπη.



Εικόνα 6: RBC genotyping and transfusion safety

Stephanie A. Bocoz , Gaëlle Le Goff , Loïc J. Blum and Christophe A. Marquette
Molecular Typing of Blood Cell Antigens, Chapter 9

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του Ελληνικού πληθυσμού ως προς το σύστημα Duffy και η καταγραφή των συχνοτήτων των αλληλίων του, όπως προκύπτουν από την μοριακή ανάλυση του γονοτύπου, εφαρμόζοντας τη μέθοδο **BioArray BeadChip** (PreciseType HEA Molecular BeadChip Test), με έμφαση στην ανίχνευση του φαινοτύπου Fy(b+^{weak}).

2. ΥΛΙΚΟ: Εξετάστηκαν συνολικά **1043** δείγματα ολικού αίματος, που αφορούσαν ασθενείς Μονάδων Μεσογειακής Αναιμίας, από διάφορες περιοχές της Ελλάδος, που εστάλησαν στο εργαστήριο Ανοσοαιματολογίας του Εθνικού Κέντρου Αιμοδοσίας (Ε.ΚΕ.Α) για περαιτέρω διερεύνηση του ερυθροκυτταρικού τους φαινοτύπου με μοριακή μέθοδο. Όλα τα εξεταζόμενα άτομα ανήκαν στη λευκή φυλή, με Ελληνική υπηκοότητα, άνδρες και γυναίκες, με μεγάλο εύρος ηλικιών. Από όλους ζητήθηκε και δόθηκε η έγγραφη συγκατάθεσή τους για τη διενέργεια του παραπάνω ελέγχου.

Απομονώθηκε DNA από περιφερικό ολικό αίμα σε EDTA (φιαλίδιο γενικής αίματος), και τυποποιήθηκαν με τη μοριακή μέθοδο Human Erythrocyte Antigen BeadChip, 11 αντιγονικά συστήματα, μεταξύ των οποίων το σύστημα Duffy.

3. ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA έγινε με τη χρήση του QIAamp DSP DNA Blood Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) στο πλήρως αυτοματοποιημένο σύστημα QIAcube, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή [105]. Η μέθοδος περιλαμβάνει 4 στάδια:

3.1.1 Λύση των κυττάρων σε 200μl ολικού αίματος

Τα κύτταρα λύνονται κάτω από συνθήκες αποδιάταξης που περιλαμβάνουν αυξημένες θερμοκρασίες και τη παρουσία της πρωτεάσης QIAGEN (QP) και του ειδικού διαλύματος λύσης (AL).

3.1.2 Πρόσδεση του γενωμικού DNA στη μεμβράνη της QIAamp Mini spin στήλης

Για τη βελτιστοποίηση της πρόσδεσης του γενωμικού DNA στη μεμβράνη της στήλης (QIAamp Mini spin column) σε πρώτη φάση προστίθεται αιθανόλη στο προϊόν λύσης των κυττάρων αίματος. Στο επόμενο βήμα, το προϊόν λύσης μεταφέρεται στη στήλη και με τη κατάλληλη φυγοκέντρωση το προϊόν διαπερνά τη στήλη, ενώ το γενωμικό

DNA που έχει απελευθερωθεί κατά τη λύση των κυττάρων προσδένεται στη μεμβράνη της.

3.1.3 Πλύσιμο της μεμβράνης

Το πλύσιμο της μεμβράνης με ρυθμιστικά διαλύματα απομακρύνει τα κυτταρικά υπολείμματα και

3.1.4 Έκλυση του γενωμικού DNA από τη μεμβράνη

Το προσδεμένο στη μεμβράνη γενωμικό DNA εκλύεται με τη βοήθεια διαλύματος (AE) ποσότητας 100μl, με τελική συγκέντρωση DNA που κυμαίνεται από 20 έως 80ng, ανάλογα με τη περιεκτικότητα του αρχικού δείγματος σε λευκοκύτταρα.

3.2 Μοριακή Ανάλυση

Για τη μοριακή ανάλυση του συστήματος Duffy, στα 1043 δείγματα ασθενών που επεξεργαστήκαμε, χρησιμοποιήσαμε το HEA BeadChip kit, το οποίο προορίζεται για το μοριακό προσδιορισμό των αλληλομόρφων που υποδηλώνουν τον ερυθροκυτταρικό αντιγονικό φαινότυπο για τα αντιγονικά συστήματα **Rh** (C,c,E,e,V,VS), **Kell** (K,k,Kpa,Kpb,Jsa,Jsb), **Duffy** (Fya,Fyb, GATA, Fyx), **Kidd** (Jka,Jkb), **MNS** (M,N,S,s,U,Uvar), **Lutheran** (Lua,Lub), **Dombrock** (Doa,Dob,Hy,Joa), **Landsteiner-Wiener** (LWa,LWb), **Diego** (Dia,Dib), **Colton** (Coa,Cob) και **Scianna** (Sc1,Sc2) ως εναλλακτική των ορολογικών μεθόδων τυποποίησης. Το τεστ επίσης ανιχνεύει μία μετάλλαξη η οποία καθορίζει τη κατάσταση της Αιμοσφαιρίνης S (**Πίνακας 6**)

Για την τυποποίηση του συστήματος Duffy, η μέθοδος ανιχνεύει τους τρεις πολυμορφισμούς: 125G>A (Fya/Fyb), -67T>C (GATA, silencingFY), 265C>T (FY^x[Fy(b^{weak})])

Μετά την ενίσχυση των πολλαπλών στόχων μέσω PCR και τη διαδικασία Clean-up και Lambda Exonuclease που ακολουθεί, τα μονόκλιωνα κομμάτια DNA επωάζονται πάνω σε ακινητοποιημένα σε επιφάνεια μικροσφαιρίδια, επιτρέποντας έτσι τη σύνδεσή τους με τους αντίστοιχους ανιχνευτές που βρίσκονται πάνω στα μικροσφαιρίδια. Στη φάση επιμήκυνσης των ανιχνευτών που ακολουθεί, ενσωματώνονται σημασμένα με φθορίζουσα ουσία νουκλεοτίδια (dNTPs), μόνο όμως στους ανιχνευτές που παρουσιάζουν απόλυτη ομολογία στο 3' άκρο τους με το συνδεδεμένο τμήμα DNA.

Τα προϊόντα επιμήκυνσης των αλληλομόρφων A και B ανιχνεύονται ταυτόχρονα κατά την απεικόνιση όλης της μικροσυστοιχίας. Κάθε ανιχνευτής είναι ομοιοπολικά προσαρτημένος σε έναν φασματικά διακριτό τύπο μικροσφαιριδίων και όλα μαζί

αποτελούν μια βιβλιοθήκη διακριτών μικροσφαιριδίων που περιέχει όλους τους προς μελέτη ανιχνευτές, συμπεριλαμβανομένων όλων των απαραίτητων εσωτερικών

Πίνακας 6: Genetic markers for Red Blood Cell Antigens in the Precise Type HEA test (Immucor.com)

Blood Group System	Analyte	Polymorphism	ISBT Phenotype	ISBT Genotype
Rh	c/C	307 C>T	RH4, RH2	RHCE*4, RHCE*2
		109 Ins		
	e/E	676 G>C	RH5, RH3	RHCE*5, RHCE*3
	VS	733 C>G, 1006 G>T	RH20	RHCE*01.20.01, RHCE01.20.02, RHCE*01.20.04, RHCE*01.20.05
V	RH10			
Kell	K/k	698 T>C	KEL1, KEL2	KEL*01, KEL*02
	Js ^a /Js ^b	1910 C>T	KEL6, KEL7	KEL*06, KEL*07
	Kp ^a /Kp ^b	961 T>C	KEL3, KEL4	KEL*03, KEL*04
Duffy	Fy ^a /Fy ^b	125 G>A	FY1, FY2	FY*01, FY*02
	GATA (Silencing FY)	-67 T>C**	FY-2	FY*02N.01
	Fy ⁱ [Fy(b ⁺ a ⁻)]	265 C>T	FY2W	FY*02M
Kidd	Jk ^a /Jk ^b	838 G>A	JK1, JK2	JK*01, JK*02
MNS	M/N	59 C>T	MNS1, MNS2	GYPA*01, GYPA*02
	S/s	143 T>C	MNS3, MNS4	GYPB*03, GYPB*04
	Silencing S (Uvar, Uneg)	230C>T	MNS-3, 5W, MNS-3,-4,-5	GYPB*03N.01 or GYPB*03N.02
		In5 g>t		GYPB*03N.03 or GYPB*03N.04
Lutheran	Lu ^a /Lu ^b	230 A>G	LU1, LU2	LU*01, LU*02
Dombrock	Do ^a /Do ^b	793 A>G	DO1, DO2	DO*01, DO*02
	Hy ⁺ /Hy	323 G>T	DO4	DO*04
	Jo(a ⁺)/Jo(a)	350 C>T	DO5	DO*05
Landsteiner- Wiener	LW ^a /LW ^b	308 A>G	LW5, LW7	LW*05, LW*07
Diego	Di ^b /Di ^a	2561 C>T	DI2, DI1	DI*02, DI*01
Colton	Co ^a /Co ^b	134 C>T	CO1, CO2	CO*01, CO*02
Scianna	Sc1/Sc2	169 G>A	SC1, SC2	SC*01, SC*02

** The GATA mutation listed here has been previously reported at -33 and -46 (ISBT Working Party)[8].

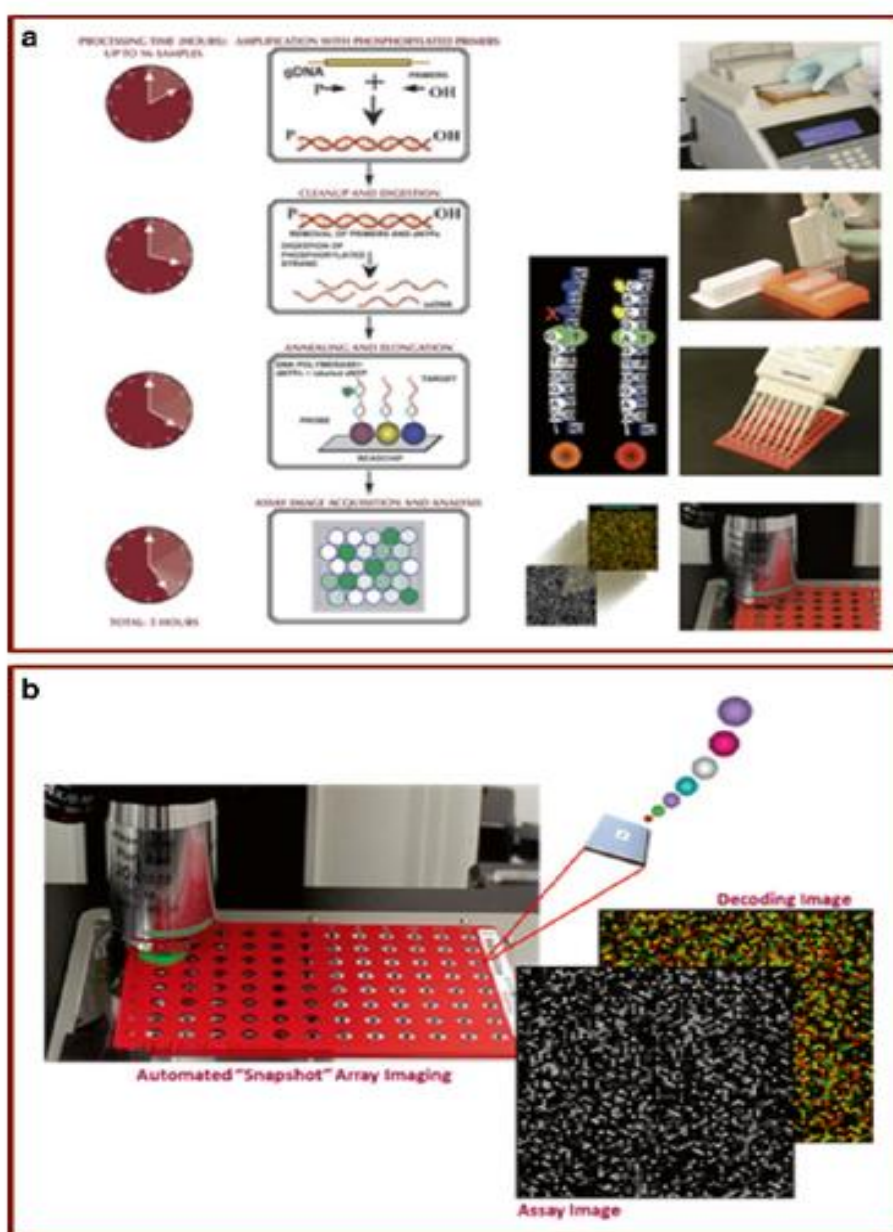
ελέγχων. Όλη η βιβλιοθήκη είναι ακινητοποιημένη στη μικροσυστοιχία BeadChip, επιτρέποντας έτσι τη ταυτόχρονη ανίχνευση όλων των ζητούμενων πολυμορφισμών.

Το BioArray Array Imaging System™ (AIS™ 400C), προσλαμβάνει το σήμα φθορισμού από κάθε ανεξάρτητο μικροσφαιρίδιο μέσα από την ενιαία εικόνα όλης της μικροσυστοιχίας, προσδιορίζει τη ταυτότητα του μικροσφαιριδίου από το χρώμα του,

τη θέση του στη συστοιχία και αναφέρει τη μέση ένταση σήματος, το συντελεστή τυπικής απόκλισης διακύμανσης των εντάσεων (coefficient of variance standard deviation of the intensities) και τον αριθμό των σφαιριδίων που μετρήθηκαν για κάθε τύπο ανιχνευτή.

Το λογισμικό HEA Analysis του πληροφοριακού συστήματος BioArray Solutions Information System (BASIS) που συμπληρώνει τη μέθοδο, εισάγει τα αρχικά δεδομένα από τη μέτρηση των εντάσεων, αξιολογεί την εγκυρότητα των εσωτερικών ελέγχων και παράγει τα αποτελέσματα της ανάλυσης

Η αρχή της μεθόδου περιγράφεται στην **Εικόνα 7**.



Εικόνα 7. HEA genotyping using the BeadChip array. (**a**) Main steps of the method,

(b) Interpretation by overlapping of the decoding and array images
Immucor Medizinische Diagnostik GmbH

3.2.1 Εξοπλισμός - Αντιδραστήρια

- Για την εφαρμογή της μεθόδου εγκαταστάθηκε στο εργαστήριό μας, από τη προμηθεύτρια εταιρεία, ο παρακάτω εξοπλισμός:
- Defrost-free freezer ($\leq -20^{\circ}\text{C}$)
- Refrigerator ($2-8^{\circ}\text{C}$)
- QIAGEN[®] QIACube[®] για την απομόνωση του DNA
- Thermal cycler (Applied Biosystems Veriti)
- Hybridization (incubation) Oven (Boeckel)



Immucor.com

- AIS400 Array Imaging System [(BioArray) 790-10007, 790-20016]
-
- Ο προαπαιτούμενος εξοπλισμός περιελάμβανε:
 - Cryo blocks
 - Φυγόκεντρο μικροπλακών
 - PCR tube racks
 - PCR workstation hood με UV light
 - Πιπέτες ακριβείας, -απλές ή πολυκάναλες - ικανές για διαμοίραση όγκων από 2 έως 1000 μL
 - Φυγοκεντρικά σωληνάρια τύπου Eppendorf
 - Vortex με ειδικούς υποδοχείς για σωληνάρια ή πλάκες

- Τα αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν περιελάμβαναν:
 - 1.5 mL σωληνάρια τύπου Eppendorf
 - 2.0 mL σωληνάρια τύπου Eppendorf
 - 8-Tube strip 0.2 mL λεπτού τοιχώματος, ειδικά για θερμικό κυκλοποιητή, με τα καπάκια τους
 - Αναλώσιμα ρύγχη με φίλτρο (aerosol-resistant) για όγκους από 0.1 μ L έως 1000 μ L
 - Απεσταγμένο νερό για το πλύσιμο της πλάκας BeadChip
 - Compressed/canned air, oil free
 - Απολυμαντικό (αραιό διάλυμα χλωρίνης)

- Το σετ αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήσαμε για τη μοριακή ανάλυση του εκτεταμένου φαινοτύπου εντός της συσκευασίας περιελάμβανε:



HEA BeadChip kit, Immucor.com

- HEA 1.2 PCR Mix
 - Clean-up Reagent
 - Lambda Exonuclease
 - eMAP™ Elongation Mix
 - HotstarTaq® DNA Polymerase
 - Negative Control (PCR grade water – No-DNA control)
(θερμοκρασία αποθήκευσης: -20°C)
-
- Το σετ αντιδραστηρίων συμπλήρωναν τα:
 - HEA 8-BeadChip Carrier (θερμοκρασία φύλαξης: +4°C)



- HEA Carrier Data CD

Κατά τις διαδικασίες απομόνωσης DNA και μοριακής ανάλυσης (PCR, post-PCR) τηρήθηκαν όλα τα πρωτόκολλα ασφαλείας και σωστού χειρισμού των προς εξέταση δειγμάτων, καθώς και όλοι οι κανόνες της καλής εργαστηριακής πρακτικής (GLP), με σκοπό να αποφευχθούν πιθανές επιμολύνσεις δειγμάτων και αντιδραστηρίων που θα οδηγούσαν σε ανακριβή αποτελέσματα.

3.2.2 Συλλογή και Προετοιμασία δειγμάτων

- Τα προς εξέταση δείγματα συλλέγονται σε σωληνάρια γενικής αίματος με EDTA, ώστε να αποκλειστούν ανασταλτικοί παράγοντες της PCR, όπως είναι το κιτρικό ή η ηπαρίνη.
- Το αποκτηθέν γενωμικό υλικό (DNA) διατηρείται στους -20°C , σε κατάλληλο καταψύκτη και αποφεύγονται πολλαπλοί κύκλοι ψύξης/απόψυξης.
- Για τη βέλτιστη ενίσχυση του αποκτηθέντος DNA μέσω PCR, η πλατφόρμα BeadChip απαιτεί συγκέντρωση $\geq 10\text{ng}/\mu\text{L}$, η οποία επιτεύχθηκε σε όλα τα προς εξέταση δείγματα.

3.3 Διαδικασία

3.3.1 Σημειώσεις

1. Για να μειωθούν οι περιπτώσεις επιμόλυνσης, είναι υποχρεωτική η χρήση τριών ξεχωριστών χώρων εργασίας: 1. pre-PCR/ έναρξης, 2. Προσθήκης DNA, 3. post-PCR διαδικασιών:

- Τα βήματα στο PCR Master Mix Preparation πραγματοποιούνται στη pre-PCR περιοχή που περιλαμβάνει PCR σταθμό εργασίας με hood, χρησιμοποιώντας ρύγχη με φίλτρο
- Τα βήματα προσθήκης DNA πραγματοποιούνται εκτός hood, χρησιμοποιώντας ρύγχη με φίλτρο
- Η υπόλοιπη διαδικασία πραγματοποιείται σε post-PCR περιοχή, που περιλαμβάνει το θερμικό κυκλοποιητή PCR, το φούρνο υβριδισμού και το σύστημα ανίχνευσης AIS 400 Array Imaging.

2. Πριν την έναρξη της διαδικασίας, σκουπίζουμε όλες τις επιφάνειες που θα χρησιμοποιήσουμε με 10% χλωρίνη.

3. Πριν τη χρήση του hood, αποστειρώνουμε το χώρο με φως UV για τουλάχιστον 15-20 λεπτά.
4. Χρησιμοποιούμε ρύγχη με φίλτρα για όλα τα βήματα της διαδικασίας
5. Οι πολυκάναλες ή μονοκάναλες πιπέττες που χρησιμοποιούμε είναι βαθμονομημένες και ρυθμισμένες.
6. Για να εξασφαλιστεί η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων δίνουμε μεγάλη σημασία στην ακριβή διανομή των δειγμάτων και των αντιδραστηρίων.
7. Τα δείγματα και τα αντιδραστήρια αναμιγνύονται επαρκώς, ενώ αποφεύγουμε τυχόν άφρισμα.
8. Όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα, αφού ξεπαγώσουν και μέχρι τη χρήση τους διατηρούνται στο πάγο ή σε cryoblock.
9. Επιβεβαιώνουμε ότι ο θερμικός κυκλοποιητής Verity είναι προ-προγραμματισμένος για κάθε PCR και Post PCR βήμα. Πριν την έναρξη των βημάτων επιβεβαιώνουμε ότι έχουμε επιλέξει το σωστό προφίλ.
10. Τα αποτελέσματα κατά την ανάλυση του γονοτύπου με την εφαρμογή της τεχνικής HEA, έχει βρεθεί να επηρεάζονται από επιμόλυνση με ξένο DNA σε συγκέντρωση >10ng ανά αντίδραση. Η επιμόλυνση στους αρνητικούς βαθμονομητές είναι ανιχνεύσιμη σε πολύ μικρότερη συγκέντρωση DNA, της τάξεως του 0,2ng ανά αντίδραση.
11. Αφαιρούμε τους φορείς HEA BeadChip από το ψυγείο που βρίσκονται αποθηκευμένοι και τους κρατάμε σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση (περίπου 15 με 20 λεπτά).
12. Είναι εξαιρετικά σημαντικό να αποφεύγεται η διασταυρούμενη επιμόλυνση μεταξύ των βυθισμάτων των BeadChips. Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά τη διανομή με πιπέττα, το ξέπλυμα και την απομάκρυνση των υγρών.
13. Βάζουμε σε λειτουργία το σύστημα BioArray Solutions AIS 400 Array Imaging και το φούρνο υβριδισμού (Boekel) τουλάχιστον 30 λεπτά πριν τη χρήση τους και ρυθμίζουμε τη θερμοκρασία στους 53°C. Τοποθετούμε δύο χάρτινες πετσέτες στο δίσκο του φούρνου υβριδισμού και τις διαβρέχουμε με συνολικά 25ml απιονισμένο νερό για να διατηρηθεί η υγρασία κατά τη διάρκεια της επώασης.
14. Πριν από κάθε χρήση του AIS 400, υποχρεωτικά, μετράμε τον ειδικό BeadChip φορέα Exposure Test Carrier (ETC) ώστε να πιστοποιηθεί η σωστή απόδοση του συστήματος.

Αναλυτικά, κατά την εκτέλεση της μεθόδου και σύμφωνα με το εσώκλειστο οδηγιόν της κατασκευάστριας εταιρείας, πραγματοποιήθηκαν τα παρακάτω στάδια:

3.3.2 Προετοιμασία του PCR Master Mix

Επισημάνσεις

1. Προετοιμάζουμε το PCR Master Mix μέσα σε ένα hood σταθμό εργασίας για να αποφύγουμε τυχόν επιμολύνσεις.
2. Το Working PCR Master Mix πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως, μπορεί όμως, αν χρειαστεί, να διατηρηθεί σε cryoblock (2-8°C) ή σε πάγο μέχρι και 15 λεπτά.
3. Η διαδικασία ανασύστασης του Master Mix και προσθήκης DNA φροντίζουμε να μη ξεπεράσει τα 30 λεπτά.

Σημείωση: Τοποθετούμε τα δείγματα και τους βαθμονομητές με σειρά σύμφωνα με την οποία θα τα προσθέσουμε στα PCR-strips και καταγράφουμε τη σειρά τους για την αντιστοίχησή τους με τα αποτελέσματα.

Διαδικασία δοκιμασίας

1. Προετοιμασία δειγμάτων και αντιδραστηρίων

1.1. Αφαιρούμε από το ψυγείο το PCR Mix (κίτρινο καπάκι) και το ξεπαγώνουμε σε θερμοκρασία δωματίου. Το τοποθετούμε στο cryoblock (2-8°C) όταν έχει ξεπαγώσει τελείως. Το ξεπάγωμα διαρκεί 15 με 30 λεπτά και εξαρτάται από τον όγκο του αντιδραστηρίου στο σωληνάριο. Εφαρμόζουμε σύντομη ανάδευση και φυγοκέντρηση πριν από τη χρήση (περίπου 3 με 5 δευτερόλεπτα).

1.2. Αφαιρούμε από το ψυγείο τη HotStarTaq DNA πολυμεράση (πορτοκαλί καπάκι) και την τοποθετούμε σε cryoblock (2-8°C) ή στον πάγο. Εφαρμόζουμε σύντομη ανάδευση και φυγοκέντρηση πριν από τη χρήση (περίπου 3 με 5 δευτερόλεπτα).

1.3. Φέρνουμε τα δείγματα DNA σε θερμοκρασία δωματίου. Εφαρμόζουμε και σε αυτά σύντομη ανάδευση και φυγοκέντρηση πριν από τη χρήση (περίπου 3 με 5 δευτερόλεπτα).

2. Προετοιμασία του PCR Master Mix

2.1. Προσδιορίζουμε τον αριθμό των δειγμάτων και των βαθμονομητών που πρόκειται να τρέξουμε

2.2. Σημαίνουμε το σωληνάριο τύπου Eppendorf για το PCR Master Mix.

2.3. Προετοιμάζουμε το PCR Master Mix επιλέγοντας τους κατάλληλους, με βάση τον αριθμό των προς εξέταση δειγμάτων, όγκους, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα. Αμέσως μετά επιστρέφουμε το αντιδραστήριο στη σωστή θερμοκρασία αποθήκευσης.

Sample #	1	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
PCR Mix (μL)	16	144	296	448	592	736	880	1008	1168	1296	1456	1584	1744
HotStarTaq DNA Polymerase (μL)	1.0	9.0	18.5	28.0	37.0	46.0	55.0	63.0	73.0	81.0	91.0	99.0	109.0

Σημ.: Ο πίνακας προορίζεται ως κατευθυντήρια γραμμή και υπολογίζει 10% με 20% περισσότερο αντιδραστήριο από ότι είναι απαραίτητο για την ολοκλήρωση της δοκιμασίας

2.3.1. Προσθέτουμε τη κατάλληλη ποσότητα HEA eMAP PCR στο σημασμένο σωληνάριο χρησιμοποιώντας μια μονοκάναλη πιπέττα. Εισάγουμε προσεκτικά το ρύγχος με φίλτρο, της πιπέττας, στο αντιδραστήριο προσέχοντας να μην ξεχειλίσει και να μη πιτσιλίσει.

2.3.2. Προσθέτουμε τη κατάλληλη ποσότητα της HotStarTaq πολυμεράσης στο ίδιο σωληνάριο με το PCR mix, χρησιμοποιώντας μονοκάναλη πιπέττα και αναδεύουμε τρεις φορές. Αμέσως επιστρέφουμε το αντιδραστήριο στο cryoblock (2-8°C) και στη συνέχεια στον καταψύκτη αποθήκευσης

2.3.3. Ασφαλίζουμε το καπάκι του σωληναρίου με το PCR Master Mix, πραγματοποιούμε σύντομη ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση (περίπου 3 με 5 δευτερόλεπτα) πριν τη χρήση. Διατηρούμε το PCR Master Mix σε cryoblock (2-8°C) μέχρι τη χρήση του.

2.4. Καθορίζουμε τον αριθμό των δειγμάτων που σκοπεύουμε να επεξεργαστούμε στη κάθε εφαρμογή της διαδικασίας, ο οποίος, για τις δικές μας δυνατότητες, κυμαινόταν από 8 έως 32, συμπεριλαμβανομένου του αρνητικού μάρτυρα, ώστε να συμπληρώνονται τα αντίστοιχα 8-tube strips και οι αντίστοιχοι BeadChip φορείς.

2.5. Μοιράζουμε 17μL από το PCR Master Mix σε κάθε πηγαδάκι του 8-tube strip και απορρίπτουμε όσο δεν έχει χρησιμοποιηθεί.

2.6. Καλύπτουμε το 8-tube strip με το συνοδό καπάκι του και το μεταφέρουμε έξω από το hood, όπου γίνεται η προσθήκη του DNA.

3.3.3 Προσθήκη του DNA

1. Αναδεύουμε σε vortex και φυγοκεντρούμε τα δείγματα DNA, όπως προαναφέρθηκε στη προετοιμασία του δείγματος
2. Προσθέτουμε στο 1^ο πηγαδάκι του strip, που περιέχει ήδη το PCR Master Mix, 8μL αρνητικού μάρτυρα, χρησιμοποιώντας μονοκάναλη πιπέττα και ρύγχος με φίλτρο. Ο αρνητικός μάρτυρας είναι υψηλής καθαρότητας νερό (H₂O), ελεύθερο νουκλεασών.
3. Σε κάθε νέα παρτίδα αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούμε, προσθέτουμε σε επιλεγμένο πηγαδάκι 8μL θετικού μάρτυρα (δείγμα με γνωστό φαινότυπο), χρησιμοποιώντας μονοκάναλη πιπέττα και ρύγχος με φίλτρο.
4. Στα εναπομείναντα πηγαδάκια του ίδιου strip, προσθέτουμε 8μL από το δείγμα DNA με τον ίδιο τρόπο. Όπως και με το θετικό μάρτυρα, αναμιγνύουμε με την πιπέττα 3 φορές, αναρροφώντας, ώστε να επιβεβαιώσουμε ότι έχει ολοκληρωθεί η μεταφορά του DNA.
5. Καλύπτουμε το 8-tube strip με το συνοδό καπάκι του και σφραγίζουμε καλά ώστε να εμποδίσουμε πιθανή εξάτμιση.
6. Αναδεύουμε ελαφρά σε vortex για 3-5 δευτερόλεπτα και φυγοκεντρούμε ήπια στις 1000rpm για να έρθει όλο στο δείγμα στο πυθμένα.

3.3.4 Πολλαπλασιασμός των στόχων μέσω PCR

1. Τοποθετούμε τα strips προς το κέντρο της υποδοχής του θερμικού κυκλοποιητή
2. Κλείνουμε το καπάκι και σπρώχνουμε το χερούλι κάτω.
3. Επιλέγουμε την εντολή από το μενού “Browse/New Methods” το πρόγραμμα “HEA PCR” και επιλέγουμε την εντολή «View» για να επιβεβαιώσουμε ότι το πρόγραμμα είναι το σωστό:

HEA PCR Program

94°C	15 min	}	30 cycles
94°C	30 sec, 60% ramp		
60°C	30 sec, 50% ramp		
68°C	50 sec, 35% ramp		
68°C	8 min		
4°C	(no longer than 72 hours)		

4. Μετά την επαλήθευση επιλέγουμε «Run». Ο όγκος της αντίδρασης αναμένεται να είναι 25μL. Ενεργοποιούμε τη λειτουργία θερμαινόμενου καλύμματος με τη θερμοκρασία να έχει προγραμματιστεί στους 105°C.
5. Επιλέγουμε «Start Run Now» για να ξεκινήσει η διαδικασία, το καπάκι έχει θερμανθεί και το πρόγραμμα έχει ξεκινήσει.

6. Όταν το πρόγραμμα ολοκληρωθεί και η θερμοκρασία στο τελευταίο στάδιο φτάσει τους 4°C αφαιρούμε τα strips από τον θερμικό κυκλοποιητή, αναδεύουμε ήπια στο vortex και φυγοκεντρούμε στις 1000rpm για 5 δευτερόλεπτα.

Σημείωση: Τα φυγοκεντρημένα ενισχυμένα δείγματα και μάρτυρες πρέπει να χρησιμοποιηθούν άμεσα. Εναλλακτικά, μπορούν να αποθηκευτούν στους -20°C (ή σε χαμηλότερη θερμοκρασία) μέχρι 4 εβδομάδες.

3.3.5 Post-PCR Διαδικασία - Clean up

Επισημάνσεις

- Η διαδικασία που γίνεται στο παρόν στάδιο πρέπει να γίνεται συνεχόμενα χωρίς διακοπή, στη post-PCR περιοχή.
- Προσθέτουμε το αντιδραστήριο Clean up στο προϊόν της PCR άμεσα, σε μέγιστο ενδιάμεσο χρόνο τα 30 λεπτά από την αφαίρεση του προϊόντος από το θερμικό κυκλοποιητή.
- Το αντιδραστήριο Clean up ξεπαγώνει σε θερμοκρασία δωματίου και αμέσως μετά διατηρείται σε cryoblock (2-8°C) μέχρι τη χρήση.
- Η μεταφορά του προϊόντος της PCR στα νέα strips και η προσθήκη του αντιδραστηρίου Clean up γίνεται σε θερμοκρασία 2-8°C, που εξασφαλίζεται με τη χρήση των cryoblocks καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας.

Διαδικασία

1. Αφαιρούμε το αντιδραστήριο Clean-up (πράσινο καπάκι) από τον καταψύκτη 10-15 λεπτά πριν τη χρήση του και το τοποθετούμε στο cryoblock (2-8°C). Αναδεύουμε ήπια και φυγοκεντρούμε πριν τη χρήση του.
2. Αναδεύουμε ήπια και φυγοκεντρούμε, στις 1000 rpm για 5 δευτερόλεπτα, το προϊόν της PCR πριν τη χρήση. Άμεσα τοποθετούμε στο cryoblock.
3. Προετοιμάζουμε ίδιο αριθμό νέων 8-strips για την post-PCR διαδικασία και τα σημαίνουμε κατά απόλυτη αντιστοιχία με τα αρχικά.
4. Τοποθετούμε τα νέα post-PCR 8-strips στο cryoblock κατά την ίδια φορά με τα αρχικά strips που φέρουν το προϊόν της PCR.
5. Μεταφέρουμε 6,5μL κάθε προϊόντος PCR στον πυθμένα των αντίστοιχων πηγαδιών των νέων strips χρησιμοποιώντας μια οχτακάναλη πιπέττα.
6. Καλύπτουμε τα strips με το εναπομείναν προϊόν της PCR και το αποθηκεύουμε σε καταψύκτη στους -20°C έως -80° C μέχρι την επιτυχή ολοκλήρωση της διαδικασίας.

7. Ρίχνουμε 2μL του αντιδραστηρίου Clean Up μέσα σε κάθε πηγαδάκι του post-PCR strip χρησιμοποιώντας μια μονοκάναλη πιπέττα και ρύγχη με φίλτρο. Αναμιγνύουμε το προϊόν με τη πιπέττα, σε κάθε πηγαδάκι, 3 φορές αναρροφώντας, ώστε να γίνει η καλύτερη δυνατή ανάμιξη με το αντιδραστήριο.
 8. Καλύπτουμε το 8-tube strip με το συνοδό καπάκι του και σφραγίζουμε επίσης καλά.
 7. Αναδεύουμε ήπια σε vortex για περίπου 3-5 δευτερόλεπτα και φυγοκεντρούμε στις 1000rpm για να έρθει όλο στο δείγμα στο πυθμένα.
 8. Τοποθετούμε τα strips προς το κέντρο της υποδοχής του θερμικού κυκλοποιητή.
 9. Κλείνουμε το καπάκι και σπρώχνουμε το χερούλι κάτω.
 10. Επιλέγουμε την εντολή από το μενού “Browse/New Methods” το πρόγραμμα “HEA CleanUp” και επιλέγουμε την εντολή «View» για να επιβεβαιώσουμε ότι το πρόγραμμα είναι το σωστό:

HEA Clean Up Program:

37°C 25 min

80°C 15 min

4°C (until removal of strips but no longer than 3 hours)
 11. Μετά την επαλήθευση επιλέγουμε «Run». Ο όγκος της αντίδρασης αναμένεται να είναι μέχρι 10μL. Ενεργοποιούμε τη λειτουργία θερμαινόμενου καλύμματος με τη θερμοκρασία να έχει προγραμματιστεί στους 105°C.
 12. Επιλέγουμε «Start Run Now» για να ξεκινήσει η διαδικασία, το καπάκι έχει θερμανθεί και το πρόγραμμα έχει ξεκινήσει.
 13. Όταν το πρόγραμμα ολοκληρωθεί και η θερμοκρασία στο τελευταίο στάδιο φτάσει τους 4°C αφαιρούμε τα strips από τον θερμικό κυκλοποιητή, αναδεύουμε ήπια στο vortex και φυγοκεντρούμε στις 1000rpm για 5 δευτερόλεπτα.
- Σημείωση: Τα φυγοκεντρημένα προϊόντα χρησιμοποιούνται άμεσα. Εναλλακτικά, μπορούν να αποθηκευτούν στους -20°C (ή σε χαμηλότερη θερμοκρασία) μέχρι 72 ώρες.

3.3.6 Επεξεργασία με λ (Lambda) Εξωνουκλεάση για τη παραγωγή μονόκλωνων τμημάτων DNA (Single-Stranded Target Generation)

Επισημάνσεις

- Όλα τα βήματα πρέπει να εκτελούνται συνεχόμενα χωρίς διακοπή.

- Η Lambda Exonuclease πρέπει να αφαιρείται από τον καταψύκτη και να ξεπαγώνει κατά τη διάρκεια της φάσης Clean Up. Μόλις ξεπαγώσει, η Lambda Exonuclease διατηρείται σε cryoblock (2-8°C).
- Το προϊόν από το Post PCR Clean Up πρέπει να διατηρείται σε cryoblock (2-8°C) κατά τη διάρκεια των βημάτων που ακολουθούν.
- Προσθέτουμε τη Lambda Exonuclease στο προϊόν post-PCR CleanUp, σε μέγιστο ενδιάμεσο χρόνο τα 30 λεπτά από την αφαίρεση του προϊόντος από το θερμικό κυκλοποιητή.

Διαδικασία

1. Αφαιρούμε το αντιδραστήριο Lambda Exonuclease (μωβ καπάκι) από τον καταψύκτη 10-15 λεπτά πριν τη χρήση. Ξεπαγώνουμε σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Αναδεύουμε ήπια και φυγοκεντρούμε τα Clean Up προϊόντα πριν τη χρήση. Άμεσα τοποθετούμε στο cryoblock.
3. Αναδεύουμε τα αντιδραστήρια με vortex σε μεσαία ταχύτητα για 3-5 δευτερόλεπτα και φυγοκεντρούμε ήπια. Τοποθετούμε στο cryoblock.
9. Προσθέτουμε 2μL του αντιδραστηρίου Lambda Exonuclease σε κάθε πηγαδάκι του strip χρησιμοποιώντας μια μονοκάναλη πιπέττα και ρύγχη με φίλτρο. Αναμιγνύουμε το προϊόν με τη πιπέττα, σε κάθε πηγαδάκι, 3 φορές αναρροφώντας, ώστε να γίνει η καλύτερη δυνατή ανάμιξη με το αντιδραστήριο.
10. Πραγματοποιούμε ήπια ανάδευση στο vortex και σύντομη φυγοκέντρωση (spin) σε χαμηλές στροφές για να συγκεντρωθεί όλο το υλικό στον πυθμένα του μικροσωληναρίου.
11. Τοποθετούμε τα strips στο θερμικό κυκλοποιητή, κλείνουμε το καπάκι και σπρώχνουμε το χερούλι κάτω.
12. Επιλέγουμε την εντολή από το μενού “Browse/New Methods” το πρόγραμμα “HEA Lambda Exonuclease ” και επιλέγουμε την εντολή «View» για να επιβεβαιώσουμε ότι το πρόγραμμα είναι το σωστό:
HEA Single Stranded Target Generation Program:
37°C 25 min
80°C 15 min
4°C (no longer than 72 hours)
13. Μετά την επαλήθευση επιλέγουμε «Run». Ο όγκος της αντίδρασης αναμένεται να είναι μέχρι 12μL. Ενεργοποιούμε τη λειτουργία θερμαινόμενου καλύμματος με τη θερμοκρασία να έχει προγραμματιστεί στους 105°C.

14. Επιλέγουμε «Start Run Now» για να ξεκινήσει η διαδικασία, το καπάκι έχει θερμομανθεί και το πρόγραμμα έχει ξεκινήσει.
15. Όταν το πρόγραμμα ολοκληρωθεί και η θερμοκρασία στο τελευταίο στάδιο φτάσει τους 4°C αφαιρούμε τα strips από τον θερμικό κυκλοποιητή, αναδεύουμε ήπια στο vortex και φυγοκεντρούμε στις 1000rpm για 5 δευτερόλεπτα.
Σημείωση: Τα φυγοκεντρημένα προϊόντα χρησιμοποιούνται άμεσα. Εναλλακτικά, μπορούν να αποθηκευτούν στους -20°C (ή σε χαμηλότερη θερμοκρασία) μέχρι 72 ώρες.

3.3.7 Υβριδισμός – Φάση Επιμήκυνσης (On BeadChip Array Elongation)

Επισημάνσεις

- Όλα τα βήματα πρέπει να εκτελούνται συνεχόμενα χωρίς διακοπή.
- Το αντιδραστήριο Elongation πρέπει να αφαιρείται από τον καταψύκτη, να ξεπαγώνει κατά τη διάρκεια της φάσης Single Stranded Target Generation και στη συνέχεια να διατηρείται στο cryoblock.
- Το προϊόν από το post- PCR Lambda Exonuclease πρέπει να διατηρείται σε cryoblock (2-8°C)
- Αποφεύγουμε τη δημιουργία αφρού όταν διανέμουμε το αντιδραστήριο Elongation.
- Προσθέτουμε το αντιδραστήριο Elongation στο μονόκλωνο προϊόν, σε μέγιστο ενδιάμεσο χρόνο τα 30 λεπτά από την αφαίρεση του προϊόντος από το θερμικό κυκλοποιητή.
- Δεν αναδεύουμε με vortex, παρά μόνο ήπια με την πιπέτα, αποφεύγοντας τη δημιουργία φυσαλίδων.
- Δεν ανακινούμε το δοχείο πεπιεσμένου αέρα.

Διαδικασία

1. Προετοιμάζουμε το φούρνο υβριδισμού Boeckel τουλάχιστον 30 λεπτά πριν τη χρήση του.
 - 1.1 Ανάβουμε το φούρνο και ρυθμίζουμε τη θερμοκρασία στους 53°C
 - 1.2 Αφαιρούμε το εσωτερικό ράφι. Τοποθετούμε δυο χάρτινες πετσέτες και τις υγραίνουμε με 25ml απιονισμένο νερό.
 - 1.3 Τοποθετούμε το εσωτερικό ράφι πίσω στο φούρνο για να προθερμανθεί
2. Αφαιρούμε τους BeadChip φορείς από το ψυγείο 15-20 λεπτά πριν τη χρήση.

3. Αφαιρούμε το αντιδραστήριο eMAP Elongation Mix (καφέ καπάκι) από τον καταψύκτη 10-15 λεπτά πριν τη χρήση και τα ξεπαγώνουμε σε θερμοκρασία δωματίου. Τοποθετούμε σε ένα cryoblock (2-8°C) όταν έχει ξεπαγώσει πλήρως.
4. Αναδεύουμε ήπια και φυγοκεντρούμε τα προϊόντα Lambda σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση. Αναδεύουμε τα αντιδραστήρια με vortex για 3-5 δευτερόλεπτα και φυγοκεντρούμε στις 1000 rpm για 5 δευτερόλεπτα.
5. Τοποθετούμε τα post-PCR strips (Lambda προϊόντα) σε cryoblock (2-8°C)
6. Ρίχνουμε με προσοχή 10μL του αντιδραστηρίου Elongation μέσα σε κάθε πηγαδάκι του 8-tube strip χρησιμοποιώντας μια μονοκάναλη πιπέττα και ρύγχη με φίλτρο. Αναμιγνύουμε αντιδραστήριο και προϊόν, σε κάθε πηγαδάκι, 3 φορές αναροφώντας με τη πιπέττα, αποφεύγοντας τη δημιουργία φυσαλίδων.
7. Αφαιρούμε τους φορείς BeadChip από τη θήκη αλουμινίου και τους αριθμούμε.
8. Τους τοποθετούμε προσεκτικά στον BeadChip carrier holder χωρίς να αγγίζουμε την επιφάνειά τους.
9. Καταγράφουμε το ID του κάθε φορέα BeadChip στη λίστα των δειγμάτων, όπως αυτά έχουν προηγουμένως κατανεμηθεί στα 8-tube strips.
10. Μεταφέρουμε με οχτακάναλη πιπέττα 15μL του νέου προϊόντος από κάθε πηγαδάκι στο αντίστοιχο BeadChip.
11. Αφαιρούμε το προθερμασμένο δίσκο από το φούρνο Boeckel. Εάν υπάρξει συμπύκνωση στο εσωτερικό του καλύμματος του δίσκου την αφαιρούμε με ειδικό απορροφητικό χαρτί.
12. Τοποθετούμε προσεκτικά το BeadChip carrier holder στον προθερμασμένο δίσκο του φούρνου, και καλύπτουμε με το καπάκι του ώστε να σφραγίσει.
13. Εισάγουμε με προσοχή το δίσκο στο φούρνο και κλείνουμε τη θύρα του. Επωάζουμε για 30 λεπτά.
14. Με το πέρας της επώασης των 30 λεπτών, αφαιρούμε το Beadchip carrier holder από το φούρνο και μεταφέρουμε ξεχωριστά τους φορείς πάνω από το νεροχύτη.
15. Ξεπλένουμε το υλικό από την επιφάνεια των BeadChip φορέων με απιονισμένο νερό:
Κρατώντας το φορέα BeadChip σε κάθετη θέση, πλένουμε κάθε ένα από τα 8 BeadChip-πηγαδάκια με σταθερή ροή χρησιμοποιώντας υδροβολέα. Για τη βέλτιστη πλύση, ο υδροβολέας πρέπει να είναι κάθετος ως προς το φορέα, σε απόσταση περίπου 2 εκ. και να ρίχνει για περίπου 3 δευτερόλεπτα.
16. Αφαιρούμε τη περίσσια νερού από την επιφάνεια των BeadChip χρησιμοποιώντας συμπιεσμένο αέρα (Compressed/canned air, oil free).
17. Αφαιρούμε τα σταγονίδια νερού από την πίσω πλευρά του φορέα με το ειδικό απορροφητικό χαρτί.

18. Μεταφέρουμε το φορέα στο AIS400 Array Imaging System, για τη τελευταία φάση της διαδικασίας, που είναι η ανάκτηση των δεδομένων και η επεξεργασία τους.
19. Ο φορέας μπορεί να αποθηκευθεί, προστατευμένος από το φως, μέχρι και 72 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου πριν την ανάγνωσή του με το σύστημα.

3.3.8 Απόκτηση εικόνας (BeadChip Image Acquisition)

Επισημάνσεις

- Ενεργοποιούμε τη πηγή φωτός του BioArray AIS 400, καθώς και τον υπολογιστή τουλάχιστον 30 λεπτά πριν τη χρήση
- Εγκαθιστούμε το HEA BeadChip Data CD μια φορά ανά παρτίδα

Διαδικασία

1. Ανοίγουμε και ξεκινάμε το AISR πρόγραμμα στην επιφάνεια εργασίας.
2. Τοποθετούμε το ETC ακολουθώντας τις οδηγίες χρήσης του AIS 190-20185, για τον έλεγχο του συστήματος. Σε οποιαδήποτε απόκλιση από τα αποδεκτά όρια, παρεμβαίνει η παραγωγός εταιρεία για τις επιδιορθώσεις που απαιτούνται.
3. Αφαιρούμε το HEA BeadChip Data CD από κάθε νέα συσκευασία των BeadChip φορέων και εγκαθιστούμε τα αρχεία από το CD στον υπολογιστή.
4. Διαβάζουμε τους BeadChip φορείς χρησιμοποιώντας το BioArray AIS 400 (Array Imaging System) και επεξεργαζόμαστε τα δεδομένα κάθε φορέα χρησιμοποιώντας το HEA Analysis software στο σύστημα BASIS.
5. Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία κλείνουμε το AISR καθώς και την πηγή φωτός και συνεχίζουμε στο BASIS, όπου γίνεται η επεξεργασία όλων των δεδομένων, δημιουργούνται οι BeadChip αναφορές και συσχετίζονται με αυτές τα δείγματα που έχουμε επεξεργαστεί.

3.3.9 Γενικοί κανόνες που ακολουθήσαμε κατά την εφαρμογή της μεθόδου

1. Το σετ αντιδραστηρίων HEA BeadChip, που χρησιμοποιήσαμε για τη μοριακή ανάλυση του ερυθροκυτταρικού φαινοτύπου, έφτασε στο εργαστήριό μας συσκευασμένο σε ξηρό πάγο. Ο έλεγχος που πραγματοποιήσαμε σε κάθε παραλαβή για την αρτιότητα της συσκευασίας και της μεταφοράς δεν έδειξε παρεκκλίσεις από τα απαιτούμενα.

2. Όλα τα περιεχόμενα αντιδραστήρια στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν σε ειδικό non-frost καταψύκτη, σε θερμοκρασία -20°C . Όσα έχρηζαν αποθήκευση σε απλή συντήρηση τοποθετήθηκαν σε ψυγείο $+4^{\circ}\text{C}$. Τα δείγματα και τα αντιδραστήρια από την κατάψυξη, αποψύχονταν πριν τη χρήση τους και επέστρεφαν στις συνθήκες αποθήκευσής τους αμέσως μετά.
3. Για τη διατήρησή τους στη σωστή θερμοκρασία, κατά τη διάρκεια όλων των ενδιάμεσων βημάτων που απαιτεί η μέθοδος, χρησιμοποιήθηκαν τα ειδικά cryoblocks.
4. Σε όλα τα βήματα χειρισμού δειγμάτων και αντιδραστηρίων δόθηκε ιδιαίτερη σημασία στην αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων ή απώλειας υλικού.
5. Δεν χρησιμοποιήθηκαν ληγμένα αντιδραστήρια και δεν αναμίχθηκαν διαφορετικές παρτίδες.
6. Μετά το πέρας όλων των επώσεων στο θερμικό κυκλοποιητή, προχωρούσαμε στο επόμενο βήμα της διαδικασίας εντός δεκαλέπτου (ο μέγιστος χρόνος παραμονής στο θερμικό κυκλοποιητή μετά την ολοκλήρωση του πρωτοκόλλου, είναι 3 ώρες)
7. Το σύστημα AIS400 Array Imaging System καθώς και ο φούρνος υβριδισμού, σύμφωνα με το πρωτόκολλο έμπαιναν σε λειτουργία 30 λεπτά πριν τη χρήση τους, ώστε η πηγή φωτός να έχει φτάσει στο μέγιστο της απόδοσής της και ο φούρνος να έχει φτάσει την απαιτούμενη θερμοκρασία των 53°C .

3.3.10 Ανάλυση και επικύρωση αποτελεσμάτων

1. Σε κάθε δοκιμασία προστέθηκε αρνητικός μάρτυρας (νερό) και επιλεκτικά, κυρίως σε κάθε νέο σετ αντιδραστηρίων, προστέθηκε δείγμα DNA με γνωστό φαινότυπο ως θετικός μάρτυρας.
2. Ο αρνητικός μάρτυρας μας βοηθά στην ανίχνευση πιθανής επιμόλυνσης με γενωμικό DNA. Η ιδανική εικόνα του αρνητικού μάρτυρα στην αναφορά του φαινοτύπου είναι 33 αποτελέσματα, ενώ κάτω από 27 υπάρχει έντονη υποψία επιμόλυνσης και τα αποτελέσματα θεωρούνται άκυρα. Στη περίπτωση αυτή το τεστ επαναλαμβάνεται.
3. Το τεστ είναι ποιοτικό. Το λογισμικό BioArray Solutions Information System (BASIS) υπολογίζει τα δεδομένα από την ένταση του σήματος της μικροσυστοιχίας (array) σε κάθε ολιγονουκλεοτίδιο, ανιχνεύοντας ειδικά αλληλόμορφα, για να προσδιορίσει τη παρουσία ή την απουσία του κάθε αλληλομόρφου. Όλοι οι υπολογισμοί πραγματοποιούνται από το HEA Analysis Software που περιέχει το BASIS.

4. Στην αναφορά των αποτελεσμάτων, που αφορούν είτε το γονότυπο είτε το φαινότυπο, υπάρχουν κωδικοί προειδοποίησης για οποιοδήποτε αποτέλεσμα παρεκκλίνει από τα αποδεκτά όρια. Τέτοιοι κωδικοί είναι οι:

LS = Low Signal (η ένταση του σήματος για συγκεκριμένο αλληλόμορφο είναι πολύ χαμηλή και επομένως δεν μπορεί να αξιολογηθεί)

HB = High Background (η συνολική ένταση του σήματος είναι πολύ υψηλή, απαιτείται επανάληψη του τεστ, δίνοντας ιδιαίτερη προσοχή στη διαχείριση των αντιδραστηρίων, στη τεχνική και στο πλύσιμο του BeadChip slide)

IC = Indeterminate Call (είναι αδύνατη η ταυτοποίηση συγκεκριμένου αντιγόνου λόγω διφορούμενου σήματος)

CV = Coefficient of Variation (η διακύμανση έντασης σε συγκεκριμένους ανιχνευτές είναι πολύ υψηλή και δεν είναι δυνατή η αναφορά αποτελεσμάτων για το συγκεκριμένο δείγμα)

Τα αποτελέσματα που παίρνουμε για το γονότυπο και το φαινότυπο έχουν τη παρακάτω μορφή, όπου το A αντιστοιχεί στο κύριο αλληλόμορφο ενός επιτόπου ενώ το B στο μεταλλαγμένο:

Chip	Sample	c	e	K	k	Kpa	Kpb	Jsa	Jsb	Jka	Jkb	Fya	Fyb	M	N	S	s	Lua	Lub	Dia	Dib	Coa	Cob	Doa	Dob	Joa	Hy	LWa	LWb	Sc1	Sc2	HbS
HEA66670_5	DS_E1	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	+	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	+	0	0

Phenotype Report

Chip	Sample	RhCE-P103S	RhCE-109Ins	RhCE-A226P	RhCE-L245V	RhCE-G336C	K1/K2	Kp	Js	JKA/JKB	FYA/FYB	GPA	GPBS	LUA/LUB	DIA/DIB	COA/COB	DO-793	DO-350	DO-323	LWA/LWB	SC1/SC2	GATA	GPB-Int5	GPB-230	FY-265	HbS173
HEA66670_5	DS_E1	BB	AB	AA	AA	AA	BB	BB	AB	AA	BB	AB	BB	BB	BB	AA	BB	AA	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA	AA

Genotype Report

Οι ενδείξεις στην ανάλυση γονοτύπου αναλύονται στο πίνακα:

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ	ΕΡΜΗΝΕΙΑ
AA	Ομόζυγο ως προς το A αλληλόμορφο
BB	Ομόζυγο ως προς το B αλληλόμορφο
AB	Ετερόζυγο
Ax	Ακαθόριστο σήμα για το αλληλόμορφο B
xB	Ακαθόριστο σήμα για το αλληλόμορφο A

Και οι ενδείξεις στην ανάλυση φαινοτύπου στο πίνακα:

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ	ΕΡΜΗΝΕΙΑ
0	Αρνητικό αποτέλεσμα (έλλειψη αντιγόνου)
+	Θετικό αποτέλεσμα (παρουσία αντιγόνου)
w	Ασθενής έκφραση φαινοτύπου

3.4 Περιορισμοί της μεθόδου:

1. Ψευδώς αρνητικά και/ή μη έγκυρα αποτελέσματα μπορούν να προκύψουν όταν απρόβλεπτες μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη θέση πρόσδεσης του εκκινητή (primer) ή του ιχνηθέτη (probe) έχουν σαν αποτέλεσμα την απώλεια του αλληλομόρφου ή του αμπλικόνιου
2. Ψευδώς θετικά και/ή μη έγκυρα αποτελέσματα μπορούν να προκύψουν σε σπάνιες περιπτώσεις, κατά τις οποίες το δείγμα πιθανά φέρει γενετικές αλλαγές οι οποίες επηρεάζουν την έκφραση των ερυθροκυτταρικών αντιγόνων σε κάποιες ομάδες αίματος ή τροποποιούν γενικότερα τον ερυθροκυτταρικό φαινότυπο και δεν μπορούν να ανιχνευθούν με τη συγκεκριμένη μέθοδο. Τέτοιες αλλαγές μπορεί να είναι:
 - αλλαγές στην αλληλουχία του DNA ή απλές νουκλεοτιδικές αλλαγές, που έχουν σαν αποτέλεσμα πρόωρα κωδικόνια λήξης, απώλεια αμινοξέων, υβριδικά ή τροποποιημένα γονίδια
 - αλλαγές στο επίπεδο μεταγραφής, που περιλαμβάνει εναλλακτικό μάτισμα μειωμένη πρωτεϊνική έκφραση κ.λπ.

Σχετικό παράδειγμα αποτελεί το σύστημα Duffy, όπου, η παρουσία μιας μετάλλαξης που οδηγεί σε αποκοπή των νουκλεοτιδίων 179 και 180 (c.179_180del (Ser60fs)) και το οποίο συνδέεται με το αλληλόμορφο Fy(b) μπορεί να αλλάξει την έκφραση του αντίστοιχου αντιγόνου και να οδηγήσει σε ψευδώς θετικό σήμα.

3. Αποτυχία ανάλυσης μπορεί να συμβεί λόγω συνολικών και συστηματικών αιτιών ή ειδικότερα αιτιών που συνδέονται με το δείγμα (για οποιοδήποτε λόγο και να συμβεί όμως, όλη η διαδικασία επαναλαμβάνεται)
4. Μικροβιακή επιμόλυνση των δειγμάτων ή των αντιδραστηρίων μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα.
5. Ανεπαρκές ή, αντίθετα, υπερβολικό DNA μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλό σήμα ή απροσδιόριστο αποτέλεσμα (η συνιστώμενη ποσότητα DNA κυμαίνεται στα 80-640ng).
6. Ανεπαρκής καθαρότητα του DNA μπορεί επίσης να επηρεάσει την όλη διαδικασία, καθώς και τα αποτελέσματα.
7. Το λογισμικό της μεθόδου δεν έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε να μπορεί να μετατρέπει όλους τους δυνατούς συνδυασμούς αλληλομόρφων σε φαινότυπο, ειδικά για αντιγόνα τα οποία σχετίζονται με πολλαπλά αλληλόμορφα (περισσότερα από δύο). Για παράδειγμα, για συνδυασμούς αλληλομόρφων που δεν έχουν εκτενώς αναφερθεί στη βιβλιογραφία, το λογισμικό του συστήματος θα δώσει, κατά την ανάλυση, απροσδιόριστο σήμα.
8. Στο σύστημα Duffy, το Fy_x αλληλόμορφο κωδικοποιεί μια αμινοξική αλλαγή η οποία οδηγεί στο φαινότυπο (Fy_b+w), που σχετίζεται με διάφορα επίπεδα ασθενούς έκφρασης του αντίστοιχου αντιγόνου. Τα εγκεκριμένα anti-Fy_b αντιδραστήρια, που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του Fy_b αντιγόνου, δεν αντιδρούν πάντα με όλες αυτές τις ασθενείς εκδοχές του.

3.5 Χαρακτηριστικά απόδοσης μεθόδου:

Τα αποτελέσματα, που προέκυψαν από την αξιολόγηση της κλινικής επίδοσης έδειξαν ότι το HEA BeadChip kit είναι ασφαλές και αξιόπιστο προϊόν για το προσδιορισμό των αλληλομόρφων που καθορίζουν τα ανθρώπινα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα.

Πριν την απελευθέρωσή της, κάθε παρτίδα του HEA BeadChip kit ελέγχεται, εφαρμόζοντας τη μέθοδο, όπως περιγράφεται στις εσωκλειστες οδηγίες, σε ήδη χαρακτηρισμένο DNA, για να διασφαλιστεί η απαραίτητη αντιδραστικότητα και ειδικότητα σύμφωνα με τις Common Technical Specifications των οδηγιών που αφορούν τα In Vitro Diagnostics.

Η αποδοτικότητα των συγκεκριμένων προϊόντων εξαρτάται από τη τήρηση της συνιστώμενης μεθοδολογίας που περιλαμβάνει το εσωκλειστο οδηγιών.

Αναλυτικά τα αποτελέσματα της αξιολόγησης παρουσιάζονται στο **Πίνακα 7**:

Πίνακας 7: Performance Characteristics of all Human Erythrocyte Antigens and phenotypic variants included in the HEA BeadChip Kit (HEA BeadChip Insert-Manual)(Immucor.com)

Antigen	Positives	Sensitivity	NPV	Negatives	Specificity	PPV
C (RH2)	551	97.3%	89.4%	477	100%	100%
c (RH4)	660	100%	100%	368	100%	100%
E (RH3)	288	100%	100%	735	100%	100%
e (RH5)	975	100%	100%	48	100%	100%
V (RH10)	0	N.A.	N.A.	0	N.A.	N.A.
Vs (RH20)	0	N.A.	N.A.	0	N.A.	N.A.
K (KEL1)	106	100%	100%	766	100%	100%
k (KEL2)	622	100%	100%	70	100%	100%
Kpa (KEL3)	29	100%	100%	341	100%	100%
KpB (KEL4)	562	100%	100%	0	N.A.	N.A.
Js ^a (KEL6)	2	100%	100%	357	100%	100%
Js ^b (KEL7)	555	100%	100%	0	100%	100%

Fy^a (FY1)	445	100%	100%	405	100%	100%
Fy^b (FY2)	665	100%	100%	185	100%	100%

Jka (JK1)	601	100%	100%	252	100%	100%
Jkb (JK2)	587	100%	100%	266	100%	100%
M (MNS1)	467	100%	100%	141	100%	100%
N (MNS2)	419	100%	100%	189	100%	100%
S (MNS3)	419	100%	100%	393	100%	100%
s (MNS4)	692	100%	100%	120	100%	100%
U (MNS5)	0	N.A.	N.A.	0	N.A.	N.A.
Uvar (MNS-3, 5W)	0	N.A.	N.A.	0	N.A.	N.A.
Lu ^a (LU1)	59	100%	100%	398	99.5%	96.7%
Lu ^b (LU2)	562	100%	100%	67	82.7%	97.6%
Do ^a (DO1)	229	100%	100%	129	100%	100%
Do ^b (DO2)	289	100%	100%	68	100%	100%
Hy (DO4)	0	N.A.	N.A.	0	N.A.	N.A.
Jo(a) (DO5)	0	N.A.	N.A.	0	N.A.	N.A.
LWa (LW1)	0	N.A.	N.A.	0	N.A.	N.A.
LWb (LW2)	0	N.A.	N.A.	1	N.A.	N.A.
Di ^a (DI1)	0	N.A.	N.A.	2	N.A.	N.A.
Di ^b (DI2)	2	N.A.	N.A.	0	N.A.	N.A.
Co ^a (CO1)	526	100%	100%	22	95.7%	99.8%

Ερμηνευτικά σχόλια:

- **100%** : Διαπιστώθηκε 100% συσχετισμός του προϊόντος με παράλληλες ορολογικές μεθόδους
- **PPV - Positive Predictive Value:** αφορά το ποσοστό των θετικών ασθενών ή δειγμάτων που διαγνώστηκαν σωστά
- **NPV – Negative Predictive Value:** αφορά το ποσοστό των αρνητικών ασθενών ή δειγμάτων που διαγνώστηκαν σωστά
- **Diagnostic Sensitivity:** αντιπροσωπεύει τη πιθανότητα η συσκευή να δίνει θετικό αποτέλεσμα στη παρουσία του δείκτη-στόχου (Common Technical Specifications)
- **Diagnostic Specificity:** αντιπροσωπεύει τη πιθανότητα η συσκευή να δίνει αρνητικό αποτέλεσμα στην απουσία του δείκτη-στόχου (Common Technical Specifications)

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κατά την ανάλυση των 1043 κλινικών δειγμάτων, που πραγματοποιήσαμε στο εργαστήριό μας, εφαρμόζοντας τη μέθοδο μοριακής ανάλυσης BioArray HEA BeadChip, τυποποιήθηκαν 24 ερυθροκυτταρικοί πολυμορφισμοί οι οποίοι συνδέονται με 35 αντιγόνα από 11 αντιγονικά συστήματα [Πίνακας 6].

Στη παρούσα μελέτη εστίασαμε στο σύστημα Duffy και τους πολυμορφισμούς 125G>A (Fya/Fyb), -67T>C (GATA, silencingFY), 265C>T (FY^x[Fy(b+^{weak})] που ανιχνεύσαμε στα δείγματά μας [σκιασμένη περιοχή του Πίνακα 6].

Οι γονοτυπικοί και φαινοτυπικοί συσχετισμοί των πολυμορφισμών αναλύονται στο Πίνακα 8. Ο πολυμορφισμός **c.125G>A** προβλέπει την έκφραση των αντιγόνων Fya και Fyb, ο πολυμορφισμός **c.1-67T>C** αποτρέπει την έκφραση του αντιγόνου Fyb στα ερυθροκύτταρα και ο πολυμορφισμός **c. 265C>T** σχετίζεται με την ασθενή έκφραση του αντιγόνου Fyb. Η ονοματολογία καθορίστηκε από το ISBT Working Party on Red Cell Immunogenetics και Blood Group Terminology [50].

Για την επεξήγηση της πολυπλοκότητας που χαρακτηρίζει τα αντιγόνα Duffy, όπως αυτή αναδύεται και από τα αποτελέσματα της μελέτης μας, οι ερευνητές παρουσίασαν, ως τη πιο πιθανή εξήγηση, την έκφραση εναλλακτικών μορφών των γονιδιακών προϊόντων *ACKR1* σε συνδυασμό με διακριτές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ισομορφών που δρουν ως ανοσογόνα [28].

Πίνακας 8 - Γονοτυπικοί και Φαινοτυπικοί συσχετισμοί των πολυμορφισμών (*)

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ			ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ	ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ	ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΟ ΑΝΤΙΓΟΝΟ
125G>A Fya/Fyb	-67T>C GATA (silencing FY)	265C>T Fyx [Fy(b+w)]			
G/A	T/T	C/C	<i>FY*01/FY*02 (FY*A/FY*B)</i>	Fya+/Fyb+	Fy ^a / Fy ^b
A/A	T/T	C/C	<i>FY*02/FY*02 (FY*B/FY*B)</i>	Fya-/Fyb+	Fy ^b
A/A	T/C	C/C	<i>FY*02/FY*02N.01</i>		Fy ^b / Fy ^{es}
A/A	T/T	C/T	<i>FY*02/FY*02W.01</i>		Fy ^b / Fy ^x
G/G	T/T	C/C	<i>FY*01/FY*01 (FY*A/FY*A)</i>	Fya+/Fyb-	Fy ^a
G/A	T/C	C/C	<i>FY*01/FY*02N.01</i>		Fy ^a / Fy ^{es}
A/A	C/C	C/C	<i>FY*02N.01/FY*02N.01</i>	Fya-/Fyb-	Fy ^{es} / Fy ^{es}
G/A	T/T	C/T	<i>FY*01/FY*02W.01</i>	Fya+/Fybw	Fy ^a / Fy ^x
A/A	T/T	T/T	<i>FY*02W.01/FY*02W.01</i>	Fya-/Fybw	Fy ^x
A/A	T/C	C/T	<i>FY*02W.01/FY*02N.01</i>		Fy ^x / Fy ^{es}

*ISBT Working Party on Red Cell Immunogenetics και Blood Group Terminology

Στις αναφορές που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μοριακής ανάλυσης των διεγμάτων μας με τη μέθοδο HEABeadChip, αντιπροσωπευτικά των έξι διαφορετικών φαινοτύπων που συναντήσαμε στον υπό μελέτη πληθυσμό και των αντίστοιχων γονοτύπων.

Αναφορές

Αναφορές 1, 2, 3: Συνολική αποτύπωση των προβλεπόμενων φαινοτύπων, όπως προκύπτουν από την ανάλυση των δεδομένων μοριακής ανάλυσης 7 τυχαίων δειγμάτων με το σύστημα HEA BeadChip. Περιλαμβάνεται αρνητικός μάρτυρας.

Το σύμβολο (+) αφορά τη παρουσία του εξεταζόμενου αντιγόνου.

Το σύμβολο (0) αφορά την απουσία του εξεταζόμενου αντιγόνου.

Αναφορά 1.: Οι σκιασμένες περιοχές αφορούν κατά σειρά από πάνω προς τα κάτω:

- Φαινότυπο Fy(a-/b-) ↔ 0/0
- Φαινότυπο Fy(a+/b+) ↔ +/+
- Φαινότυπο Fy(a-/b+) ↔ 0/+
- Φαινότυπο Fy(a+/b-) ↔ +/0

Print Date: July 4, 2019

WHEA Phenotype Result Table

Chip	Sample	Status	Rh			Kell			Kidd				Duffy			MNS			Lutheran			Diego		Cotton			Dombock			LW			Scanna			Detail	Notes				
			n	c	e	k	K	Ka	Kb	Jka	Jkb	Fya	Fyb	M	N	S	s	Lua	Lub	Dh	Dib	Coa	Col	Doa	Dob	Doa	Dob	Hy	LWa	LWb	LWc	Sc1	Sc2	Hb5							
HEAH2496_1	NEGATIVE CONTROL	LS(03)	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS					
HEAH2496_2			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
HEAH2496_3	050255		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
HEAH2496_4	050256		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
HEAH2496_5	050257		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
HEAH2496_6	050260		0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
HEAH2496_7	050261		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
HEAH2496_7	050262		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
HEAH2496_8	050263		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		

Detail Code
 CV - Coefficient of variation of intensities exceeds recommended maximum
 LS - Low signal, signal intensity below recommended minimum
 HB - High background, exceeds recommended maximum
 IC - Indeterminate call

Detail Code
 Fy(a) - Weak Fy(a) expression due to mutated FY255
 Hy - or Jka) - Published reports indicate deletion of a "negative" phenotype, some RBC may react weakly
 U(-) - Possible U(-) due to GYPB gene deletion
 U(a) - Variant U allele involving G staining mutation

General Disclaimer
 (R) - Possible F 5
 W - Weakly Expressed phenotype

Αναφορά 2.: Η σκιασμένη περιοχή αφορά:

- Φαινότυπο Fy(a+/b+^{weak}) ↔ +/w

WHEA Phenotype Result Table

Print Date: July 4, 2019

Chip	Sample	Status	Rh			Kell			Kidd			Duffy		MNS			Lutheran		Diego		Colton		Dombrock			LW		Scianna			Hemoglobin S	Detail	Notes										
			c	C	e	K	k	Kpa	Kpb	Jsua	Jsbo	Jka	Jkb	Fya	Fyb	M	N	s	Lu	Lub	Di	Dib	Coa	Cob	Doa	Dob	Jo	Hy	LWa	LWb				Sci	Sc2	HbS							
HEAH2502_1	NEGATIVE CONTROL	LS(33)	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS								
HEAH2502_2	050264		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0						
HEAH2502_3	050266		0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0						
HEAH2502_4	050266		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0					
HEAH2502_5	050267		0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0					
HEAH2502_6	050268		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0				
HEAH2502_7	050269		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0				
HEAH2502_8	050270		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0		


Status Code
 CV - Coefficient of Variation of intensities, exceeds recommended maximum
 LS - Low Signal: signal intensity below recommended minimum
 HB - High Background: exceeds recommended maximum
 IC - Indeterminate call

Detail Code
 Fy(w) - Weak Fyb expression due to mutated Fy25
 Hy- or Jka) - Published reports indicate observation of a
 "negative" phenotype: some RBC may react weakly
 U(-) - Possible U(-) due to CYPB gene deletion
 U(var) - Variant U detected (involving S silencing mutation)

General Disclaimer
 (0) - Possible r'S
 w - Weakly Expressed phenotype

Αναφορά 3.: Η σκιασμένη περιοχή αφορά:

- Φαινότυπο Fy(a-/b+^{weak}) ↔ 0/w



Print Date: December 20, 2019

WHEA Phenotype Result Table

Chip	Sample	Status	Rh				Kell			Kidd				Duffy		MNS			Lutheran		Diego		Colton		Dombrock			LW		Scianna		Hemoglobin S	Detail	Notes																
			c	C	e	E	K	k	Kpa	Kpb	Usa	Usb	Jka	Jkb	Fya	Fyb	M	N	S	s	Lua	Lub	Da	Dib	Coa	Cob	Doa	Dob	Joa	Hy	LWa				LWb	Sc1	Sc2	HbS												
HEAI2646_1	NEGATIVE CONTROL	LS(33)	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LS														
HEAI2646_2	050929		0	+	0	0	+	0	0	+	0	+	0	0	+	0	0	+	0	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0												
HEAI2646_3	050930		+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	0	+	0	0	+	0	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0									
HEAI2646_4	050931		0	+	0	0	+	0	0	+	0	+	0	0	+	0	0	+	0	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0							
HEAI2646_5	050932		0	+	0	0	+	0	0	+	0	+	0	0	+	0	0	+	0	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
HEAI2646_6	050933		+	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	0	+	0	0	+	0	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
HEAI2646_7	050934		+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	0	+	0	0	+	0	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Possible VS-V+						
HEAI2646_8	050935		+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	0	+	0	0	+	0	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					

Status Code
 CV - Coefficient of Variation of intensities exceeds recommended maximum
 LS - Low Signal: signal intensity below recommended minimum
 HB - High Background: exceeds recommended maximum
 IC - Indeterminate call

Detail Code
 Fj(w) - Weak Fyo expression due to mutated FY255
 Hy- or Jya) - Published reports indicate observation of a "negative" phenotype; some RBC may react weakly
 U(-) - Possible U(-) due to GYPB gene deletion
 U(var) - Variant U detected (involving S silencing mutation)

General Disclaimer
 (0) - Possible r S
 w - Weakly Expressed phenotype

Στις αναφορές που ακολουθούν τα διαφορετικά αλληλόμορφα και στους τρεις πολυμορφισμούς, συμβολίζονται με **A** και **B**. Η ομοζυγωτία ως προς το ένα αλληλόμορφο συμβολίζεται με **AA**, η ετεροζυγωτία με **AB** και η ομοζυγωτία ως προς το δεύτερο αλληλόμορφο με **BB**.

Αναφορά 4.: Φαινότυπος Fy(a+/b+) - Γονότυπος *FY*A/FY*B (FY*01/FY*02)*

Human Erythrocyte Antigen (HEA) Genotyping by DNA Analysis Report		
Report Date/Time:	December 20, 2019 07:12 AM	Sample ID: 051388
Lot #:	19-229-C	Chip ID: HEA12648_5
Chip Read Date/Time:	December 20, 2019 06:59 AM	
Status: Ax(1)	Detail:	
Notes:		
Polymorphism	Result	Notes
RhCE-P103S	Ax	
RhCE-109Ins	AA	
RhCE-A226P	AB	
RhCE-L245V	AA	
RhCE-G336C	AA	
K1/K2	BB	
Kp	BB	
Js	BB	
JKA/JKB	AA	
FYA/FYB	AB	
GPA	BB	
GPBS	BB	
LUA/LUB	BB	
DIA/DIB	BB	
COA/COB	AA	
DO-793	BB	
DO-350	AA	
DO-323	AA	
LWA/LWB	AA	
SC1/SC2	AA	
GATA	AA	
GPB-Int5	AA	
GPB-230	AA	
FY-265	AA	
HbS1/3	BB	

Status Code
 CV - Coefficient of Variation of Intensities exceeds recommended maximum
 LS - Low Signal: signal intensity below recommended minimum
 HB - High Background: exceeds recommended maximum
 IC - Indeterminate call

Approved By:
 Signature: _____ Date: _____
 Name (Print): _____ Title: _____

Blood Group Phenotype DNA Analysis By
 Elongation - mediated Multiplex Analysis of Polymorphisms

Αναφορά 5α.: Φαινότυπος Fy(a-/b+) - Γονότυπος *FY*B/FY*B (FY*02/FY*02)*

Human Erythrocyte Antigen (HEA) Genotyping by DNA Analysis Report

Report Date/Time: December 20, 2019 07:12 AM Sample ID: 051397
 Lot #: 19-229-C Chip ID: HEA12648_6
 Chip Read Date/Time: December 20, 2019 06:59 AM
 Status: Detail:
 Notes:

Polymorphism	Result	Notes
RhCE-P103S	BB	
RhCE-109Ins	AB	
RhCE-A226P	AA	
RhCE-L245V	AA	
RhCE-G336C	AA	
K1/K2	BB	
Kp	BB	
Js	BB	
JKA/JKB	AB	
FYA/FYB	BB	
GPA	AB	
GPBS	BB	
LUA/LUB	BB	
DIA/DIB	BB	
COA/COB	AA	
DO-793	AB	
DO-350	AA	
DO-323	AA	
LWA/LWB	AA	
SCI/SC2	AA	
GATA	AA	
GPB-Int5	AA	
GPB-230	AA	
FY*265	AA	
HbS173	AA	

Status Code
 CV - Coefficient of Variation of Intensities exceeds recommended maximum
 LS - Low Signal: signal intensity below recommended minimum
 HB - High Background: exceeds recommended maximum
 IC - Indeterminate call

Approved By: _____ Date: _____
 Signature: _____
 Name (Print): _____ Title: _____

Blood Group Phenotype DNA Analysis By
 Elongation - mediated Multiplex Analysis of Polymorphisms

Αναφορά 5β.: Φαινότυπος Fy(a-/b+) - Γονότυπος *FY*02/FY*02N.01*

Human Erythrocyte Antigen (HEA) Genotyping by DNA Analysis Report

Report Date/Time: November 13, 2019 07:15 AM Sample ID: 050821
 Lot #: 19-229-C Chip ID: HEA12303_8
 Chip Read Date/Time: November 13, 2019 07:09 AM
 Status: Detail:
 Notes:

Polymorphism	Result	Notes
RhCE-P103S	BB	
RhCE-109Ins	AB	
RhCE-A226P	AA	
RhCE-L245V	AA	
RhCE-G336C	AA	
K1/K2	BB	
Kp	BB	
Js	BB	
JKA/JKB	AB	
FYA/FYB	BB	
GPA	BB	
GPBS	BB	
LUA/LUB	BB	
DIA/DIB	BB	
COA/COB	AA	
DO-793	AA	
DO-350	AA	
DO-323	AA	
LWA/LWB	AA	
SC1/SC2	AA	
GATA	AB	
GPB-Int1	AA	
GPB-230	AA	
FY-265	AA	
HbS173	AA	

Status Code
 CV - Coefficient of Variation of Intensities exceeds recommended maximum
 LS - Low Signal: signal intensity below recommended minimum
 HB - High Background: exceeds recommended maximum
 IC - Indeterminate call

Approved By: _____ Date: _____
 Signature: _____ Title: _____
 Name (Print): _____ Title: _____

Blood Group Phenotype DNA Analysis By
 Elongation - mediated Multiplex Analysis of Polymorphisms

Αναφορά 5γ.: Φαινότυπος Fy(a-/b+) - Γονότυπος *FY*02/FY*02W.01*

Human Erythrocyte Antigen (HEA) Genotyping by DNA Analysis Report

Report Date/Time: November 25, 2019 07:02 AM Sample ID: 051224
 Lot #: 19-229-C Chip ID: HEA12294_7
 Chip Read Date/Time: November 25, 2019 06:51 AM
 Status: Detail:
 Note:

Polymorphism	Result	Notes
RhCE-P103S	BB	
RhCE-109Ins	AB	
RhCE-A226P	AA	
RhCE-L245V	AA	
RhCE-G336C	AA	
K1/K2	BB	
Kp	BB	
Js	BB	
JKA/JKB	BB	
FYA/FYB	BB	
GPA	AA	
GPBS	AB	
LUA/LUB	BB	
DIA/DIB	BB	
COA/COB	AA	
DO-793	BB	
DO-350	AA	
DO-323	AA	
LWA/LWB	AA	
SC1/SC2	AA	
GATA	AA	
GPB-1115	AA	
GPB-230	AA	
FY-265	AB	
HbS173	AA	

Status Code
 CV - Coefficient of Variation of Intensities exceeds recommended maximum
 LS - Low Signal: signal intensity below recommended minimum
 HB - High Background: exceeds recommended maximum
 IC - Indeterminate call

Approved By:

Signature: _____ Date: _____

Name (Print): _____ Title: _____

Blood Group Phenotype DNA Analysis By
 Elongation - mediated Multiplex Analysis of Polymorphisms

Αναφορά 6α.: Φαινότυπος Fy(a+/b-) - Γονότυπος FY*A/FY*A (FY*01/FY*01)

Human Erythrocyte Antigen (HEA) Genotyping by DNA Analysis Report

Report Date/Time: December 20, 2019 07:12 AM Sample ID: 050905
 Lot #: 19-229-C Chip ID: HEAID651_4
 Chip Read Date/Time: December 20, 2019 07:03 AM
 Status: Detail:
 Notes:

Polymorphism	Result	Notes
RhCE-P103S	BB	
RhCE-109Ins	AB	
RhCE-A226P	AA	
RhCE-L245V	AA	
RhCE-G336C	AA	
K1/K2	BB	
Kp	AB	
Js	BB	
JKA/JKB	BB	
FYA/FYB	AA	
GPA	AB	
GPBS	BB	
LUA/LUB	BB	
DIA/DIB	BB	
COA/COB	AA	
DO-793	BB	
DO-350	AA	
DO-323	AA	
LWA/LWB	AA	
SC1/SC2	AA	
GATA	AA	
GPB-Int5	AA	
GPB-230	AA	
FY-265	AA	
HbS173	AA	

Status Code
 CV - Coefficient of Variation of Intensities exceeds recommended maximum
 LS - Low Signal: signal intensity below recommended minimum
 HB - High Background: exceeds recommended maximum
 IC - Indeterminate call

Approved By:

Signature: _____ Date: _____

Name (Print): _____ Title: _____

Blood Group Phenotype DNA Analysis By
 Elongation - mediated Multiplex Analysis of Polymorphisms

Αναφορά 6β.: Φαινότυπος Fy(a+/b-) - Γονότυπος *FY*01/FY*02N.01*

Human Erythrocyte Antigen (HEA) Genotyping by DNA Analysis Report

Report Date/Time: December 20, 2019 07:12 AM Sample ID: 051364
 Lot #: 19-229-C Chip ID: HEA12648_3
 Chip Read Date/Time: December 20, 2019 06:58 AM
 Status: Ax(1) Detail:
 Notes:

Polymorphism	Result	Notes
RhCE-P103S	Ax	
RhCE-109Ins	AA	
RhCE-A226P	BB	
RhCE-L245V	AA	
RhCE-G336C	AA	
K1/K2	BB	
Kp	BB	
Js	BB	
JKA/JKB	AB	
FYA/FYB	AB	
GPA	AA	
GPBS	AB	
LUA/LUB	BB	
DIA/DIB	BB	
COA/COB	AA	
DO-793	AB	
DO-350	AA	
DO-323	AA	
LWA/LWB	AA	
SC1/SC2	AA	
GATA	AB	
GPB-Int5	AA	
GPB-230	AA	
FY*265	AA	
HbS1/3	AA	

Status Code
 CV - Coefficient of Variation of Intensities exceeds recommended maximum
 LS - Low Signal, signal intensity below recommended minimum
 HB - High Background, exceeds recommended maximum
 IC - Indeterminate call

Approved By:

Signature: _____ Date: _____

Name (Print): _____ Title: _____

Blood Group Phenotype DNA Analysis By
 Elongation - mediated Multiplex Analysis of Polymorphisms

Αναφορά 7.: Φαινότυπος Fy(a-/b-) - Γονότυπος *FY*02N.01/FY*02N.01*

Human Erythrocyte Antigen (HEA) Genotyping by DNA Analysis Report

Report Date/Time: July 4, 2019 06:46 AM Sample ID: 050255
 Lot #: 19-80-C Chip ID: HEAH2496_2
 Chip Read Date/Time: July 4, 2019 06:40 AM
 Status: Ax(1) Detail:
 Notes:

Polymorphism	Result	Notes
RhCE-P103S	Ax	
RhCE-109Ins	AB	
RhCE-A226P	AA	
RhCE-L245V	AA	
RhCE-G336C	AA	
K1/K2	BB	
Kp	BB	
Js	BB	
JKA/JKB	AB	
FYA/FYB	BB	
GPA	AB	
GPBS	BB	
LUA/LUB	BB	
DIA/DIB	BB	
COA/COB	AA	
DO-793	BB	
DO-350	AA	
DO-323	AA	
LWA/LWB	AA	
SC1/SC2	AA	
GATA	BB	
GPB-111C	AA	
GPB-230	AA	
FY-265	AA	
HbS173	AA	

Status Code
 CV - Coefficient of Variation of Intensities exceeds recommended maximum
 LS - Low Signal: signal intensity below recommended minimum
 HB - High Background: exceeds recommended maximum
 IC - Indeterminate call

Approved By:

Signature: _____ Date: _____

Name (Print): _____ Title: _____

Blood Group Phenotype DNA Analysis By
 Elongation - mediated Multiplex Analysis of Polymorphisms

Αναφορά 8.: Φαινότυπος Fy(a+/b^{weak}) - Γονότυπος *FY*01/FY*02W.01*

Human Erythrocyte Antigen (HEA) Genotyping by DNA Analysis Report

Report Date/Time: December 17, 2019 06:59 AM Sample ID: 050845
 Lot #: 19-229-C Chip ID: HEA12236_8
 Chip Read Date/Time: December 17, 2019 06:50 AM
 Status: Ax(1) Detail:
 Notes:

Polymorphism	Result	Notes
RhCE-P103S	Ax	
RhCE-109Ins	AB	
RhCE-A226P	AA	
RhCE-L245V	AA	
RhCE-G336C	AA	
K1/K2	BB	
Kp	BB	
Js	BB	
JKA/JKB	AB	
FYA/FYB	AB	
GPA	AB	
GPBS	AA	
LUA/LUB	BB	
DIA/DIB	BB	
COA/COB	AA	
DO-793	BB	
DO-350	AA	
DO-323	AA	
LWA/LWB	AA	
SC1/SC2	AA	
GATA	AA	
GPB-Int5	AA	
GPB-230	AA	
FY-265	AB	
HbS173	AA	

Status Code
 CV - Coefficient of Variation of Intensities exceeds recommended maximum
 LS - Low Signal: signal intensity below recommended minimum
 HB - High Background: exceeds recommended maximum
 IC - Indeterminate call

Approved By:

Signature: _____ Date: _____

Name (Print): _____ Title: _____

Blood Group Phenotype DNA Analysis By
 Elongation - mediated Multiplex Analysis of Polymorphisms

Αναφορά 9α.: Φαινότυπος Fy(a-/b^{weak}) - Γονότυπος FY*02W.01/FY*02W.01

Human Erythrocyte Antigen (HEA) Genotyping by DNA Analysis Report

Report Date/Time: December 17, 2019 06:59 AM Sample ID: 050841
 Lot #: 19-229-C Chip ID: HEAI2237_2
 Chip Read Date/Time: December 17, 2019 06:51 AM
 Status: Detail:
 Notes:

Polymorphism	Result	Notes
RhCE-P103S	AA	
RhCE-109Ins	AA	
RhCE-A226P	AA	
RhCE-L245V	AA	
RhCE-G336C	AA	
K1/K2	BB	
Kp	BB	
Js	BB	
JKA/JKB	BB	
FYA/FYB	BB	
GFA	AB	
GPBS	AB	
LUA/LUB	BB	
DIA/DIB	AB	
COA/COB	AA	
DO-793	AB	
DO-350	AA	
DO-323	AA	
LWA/LWB	AA	
SC1/SC2	AA	
GATA	AA	
GPB-III ₂	AA	
GPB-230	AA	
FY-265	BB	
HbS173	AA	

Status Code
 CV - Coefficient of Variation of Intensities exceeds recommended maximum
 LS - Low Signal: signal intensity below recommended minimum
 HB - High Background: exceeds recommended maximum
 IC - Indeterminate call

Approved By:

Signature: _____ Date: _____

Name (Print): _____ Title: _____

Blood Group Phenotype DNA Analysis By
 Elongation - mediated Multiplex Analysis of Polymorphisms

Αναφορά 9β.: Φαινότυπος Fy(a-/b^{weak}) - Γονότυπος FY*02W.01/FY*02N.01

Human Erythrocyte Antigen (HEA) Genotyping by DNA Analysis Report

Report Date/Time: October 9, 2019 06:52 AM Sample ID: 050481

Lot #: 19-137-C Chip ID: HEAH6530_6

Chip Read Date/Time: October 9, 2019 06:36 AM

Status: Ax(1) Detail:

Notes:

Polymorphism	Result	Notes
RhCE-P103S	Ax	
RhCE-109Ins	AB	
RhCE-A226P	AA	
RhCE-L245V	AA	
RhCE-G336C	AA	
K1/K2	BB	
Kp	BB	
Js	BB	
JKA/JKB	AA	
FYA/FYB	BB	
GPA	AA	
GPBS	BB	
LUA/LUB	BB	
DIA/DIB	BB	
COA/COB	AA	
DO-793	BB	
DO-350	AA	
DO-323	AA	
LWA/LWB	AA	
SC1/SC2	AA	
GATA	AB	
GPB-IntD	AA	
GPB-230	AA	
FY-265	AB	
HbS173	AA	

Status Code
 CV - Coefficient of Variation of Intensities exceeds recommended maximum
 LS - Low Signal: signal intensity below recommended minimum
 HB - High Background: exceeds recommended maximum
 IC - Indeterminate call

Approved By:

Signature: _____ Date: _____

Name (Print): _____ Title: _____

Blood Group Phenotype DNA Analysis By
 Elongation - mediated Multiplex Analysis of Polymorphisms

Από τις παραπάνω αναφορές ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασαν οι εξής περιπτώσεις:

- Αναφορές 5β, 5γ, όπου, η ομοζυγωτία του *FY*B* αλληλομόρφου (A/A) για τη θέση 125G>A που καθορίζει την έκφραση των Fya και Fyb αντιγόνων, υπερκαλύπτει είτε τη μετάλλαξη στη περιοχή GATA του γονιδίου (T/C) που οδηγεί στη σίγασή του, είτε τη μετάλλαξη στη θέση 265(C/T) που συνδέεται με την ασθενή έκφραση του αντιγόνου. Ο φαινότυπος εκφράζεται κανονικά.
- Αναφορά 6β, όπου, ενώ υπάρχει το *FY*B* αλληλόμορφο (G/A) για τη θέση 125G>A που καθορίζει την έκφραση των Fya και Fyb αντιγόνων, η παρουσία της μετάλλαξης στη περιοχή GATA του γονιδίου (T/C) που οδηγεί στη σίγασή του δεν επιτρέπει την έκφραση του Fyb αντιγόνου και επομένως ο φαινότυπος εκφράζεται ως ομόζυγος για το αντιγόνο Fya.
- Αναφορά 9β, όπου, η ομοζυγωτία του *FY*B* αλληλομόρφου (A/A) για τη θέση 125G>A που καθορίζει την έκφραση των Fya και Fyb αντιγόνων, υπερκαλύπτει τη μετάλλαξη στη περιοχή GATA του γονιδίου (T/C) που οδηγεί στη σίγασή του και λόγω της μετάλλαξης στη θέση 265(C/T) που συνδέεται με την ασθενή έκφραση του αντιγόνου, ο προβλεπόμενος φαινότυπος εκφράζεται ως Fyb^{weak}.

Το επόμενο βήμα στην ανάλυση των αποτελεσμάτων μας ήταν η καταγραφή των απόλυτων αριθμών ανά γονότυπο και φαινότυπο, καθώς και των συχνοτήτων αυτών στο σύνολο των 1043 ελεγμένων δειγμάτων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στο **Πίνακα 9**.

Με βάση τα δεδομένα που αποκτήθηκαν, ο συχνότερος φαινότυπος είναι ο Fy(a+b+) με συχνότητα 44%, ακολουθεί ο φαινότυπος Fy(a-b+) με συχνότητα 33,93% και ο φαινότυπος Fy(a+b-) με συχνότητα 19,08%. Η κατανομή των Duffy φαινοτύπων αντανακλά τη κατανομή των γονοτύπων. Συγκεκριμένα, για το φαινότυπο Fy(a+b+) ο ετερόζυγος γονότυπος *FY*01/FY*02* απαντά σε ποσοστό 44%, για το φαινότυπο Fy(a-b+) οι γονότυποι *FY*02/FY*02*, *FY*02/FY*02N.01* και *FY*02/FY*02W.01* απαντούν σε ποσοστά 30,77%, 0,48% και 2,68% αντίστοιχα, ενώ για το φαινότυπο Fy(a+b-), οι γονότυποι *FY*01/FY*01* *FY*01/FY*02N.01* απαντούν σε ποσοστά 18,79% και 0,29% αντίστοιχα.

Στο σύνολο των 1043 εξεταζόμενων δειγμάτων 3 είχαν αρνητικό φαινότυπο Fy(a-b-), ενώ 28 συνολικά είχαν ασθενή έκφραση του Fyb, με γονοτύπους *FY*01/FY*02W.01* σε ποσοστό 2,30% και *FY*02W.01/FY*02W.01*, *FY*02W.01/FY*02N.01* σε ποσοστό 0,38%. Λόγω της ιδιαιτερότητας των δειγμάτων δεν ήταν εφικτός ο ορολογικός έλεγχος για τα αντιγόνα Duffy και επομένως δεν υπήρξε σύγκριση με τα δεδομένα της μελέτης μας. Επιπλέον, τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούμε για την ορολογική

ανίχνευση των αντιγόνων δεν αντιδρούν με τον ασθενή τύπο του αντιγόνου Fyb (Fyx), ο οποίος μπορεί να ανιχνευθεί μόνο με μεθόδους μοριακής τυποποίησης. Οι συχνότητες που αποτυπώνονται για κάθε γονότυπο και φαινότυπο υπολογίστηκαν με άμεση καταμέτρηση.

Πίνακας 9 – Κατανομή των συχνοτήτων των Duffy γονοτύπων και φαινοτύπων στον Ελληνικό πληθυσμό

ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ FY	ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ	ΑΡ.		% ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΟΥ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ	% ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ	Blood Transf. 2018 DATA
Fya+/Fyb+	<i>FY*A/FY*B</i> (<i>FY*01/FY*02</i>)	459		44	44	48
Fya-/Fyb+	<i>FY*B/FY*B</i> (<i>FY*02/FY*02</i>)	321	354	30.77	33.93	32
	<i>FY*02/FY*02N.01</i>	5		0.48		
	<i>FY*02/FY*02W.01</i>	28		2.68		
Fya+/Fyb-	<i>FY*A/FY*A</i> (<i>FY*01/FY*01</i>)	196	199	18.79	19.08	20
	<i>FY*01/FY*02N.01</i>	3		0.29		
Fya-/Fyb-	<i>FY*02N.01/FY*02N.01</i>	3		0.29	0.29	rare
Fya+/Fybw	<i>FY*01/FY*02W.01</i>	24		2.30	2.30	1.3
Fya-/Fybw	<i>FY*02W.01/FY*02W.01</i>	3	4	0.29	0.38	
	<i>FY*02W.01/FY*02N.01</i>	1		0.09		
ΣΥΝΟΛΟ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ		1043				

Οι μετρούμενες συχνότητες των φαινοτύπων στον Ελληνικό πληθυσμό συγκρίθηκαν με τα δεδομένα που συγκεντρώθηκαν από τους Mourant *et al* και De Silva *et al* από

μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες [Πίνακας 10]. Σύμφωνα με τα δεδομένα του πίνακα, οι συχνότητες των φαινοτύπων, που προέκυψαν από τη μελέτη μας, είναι συγκρίσιμες με αυτές που καταγράφηκαν για πληθυσμούς της Ευρώπης.

Πίνακας 10 – Τυπικές συχνότητες των Duffy φαινοτύπων σε Ευρώπη, Αφρική, Ασία. Σύγκριση με συχνότητες στον Ελληνικό πληθυσμό.

ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ % ΦΑΙΝΟΤΥΠΩΝ				ΑΛΛΗΛΙΑ
	ΕΥΡΩΠΗ	ΑΦΡΙΚΗ	ΑΣΙΑ	ΕΛΛΑΔΑ	
Fy(a+b+)	48	3	9	44	FY*A/FY*B
Fy(a-b+)	32	20	1.8	33.93	FY*B/FY*B
Fy(a+b-)	20	10	89.2	19.08	FY*A/FY*A
Fy(a-b-)	σπάνιο	67	0	0.29	FY*
Fy(a+bw)				2.30	
Fy(a-bw)				0.38	

Στη συνέχεια επεξεργαστήκαμε τα δεδομένα της μοριακής ανάλυσης, όπως αυτά καταγράφονται στο σύνολο των αναφορών, ως προς τα αλλήλια που είναι υπεύθυνα για την έκφραση των Fya και Fyb αντιγόνων, καθώς και για την ασθενή έκφραση του αντιγόνου Fyb (Fyb^{weak}). Τα αποτελέσματα της καταγραφής των επιμέρους καθώς και των συνολικών δεδομένων ανά προβλεπόμενο φαινότυπο παρουσιάζονται στον **Πίνακα 11**.

Σύμφωνα με τα δεδομένα μας, ο απλός νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός rs12075*A, ο οποίος καθορίζει το *FY*B* αλλήλιο σε ποσοστό για τον Ελληνικό πληθυσμό 0.580, είναι ο επικρατέστερος συγκριτικά με το πολυμορφισμό rs12075*G, που καθορίζει το *FY*A* αλλήλιο και απαντά σε ποσοστό 0.420. Το αποτέλεσμα βρίσκεται σε συμφωνία με τα δεδομένα του 1000 Genome Project [Πίνακας 12], όπου επίσης φαίνεται ότι, το αλλήλιο *FY*B*, είναι κοινό σε πληθυσμούς της Αφρικής (0.981), αλλά όχι στην Ανατολική Ασία (0.077), ενώ το *FY*A* αλλήλιο είναι επικρατές στην Ανατολική Ασία (0.923) και σπάνιο στους Αφρικανούς (0.019). Σπάνιος δε αποδεικνύεται και για τον Ελληνικό πληθυσμό ο πολυμορφισμός rs34599082*T που καθορίζει την ασθενή έκφραση του *FY*01W.01* αλληλίου και απαντά σε ποσοστό 0.028, συχνότητα όμως που αποδεικνύεται υψηλότερη από αυτή που απαντάται στις άλλες ηπείρους. Το αλληλόμορφο *FY*2N.01* απαντά συνολικά σε ποσοστό 0.007 (15/2086 αλλήλια), ενώ σε ομόζυγη κατάσταση, κατά την οποία εκφράζεται ο αρνητικός φαινότυπος, σε ποσοστό 0.003 στο σύνολο των 2086 αλληλίων (1043 δείγματα). Τα ευρήματά μας συμφωνούν με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας που αναφέρουν τη σπανιότητα του αλληλομόρφου και κατ'έκταση του φαινοτύπου Fy(a-/b-) στους Καυκάσιους.

Πίνακας 11 – Υποσύνολα και σύνολα αλληλίων σύμφωνα με τους προβλεπόμενους φαινότυπους

ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ FY	ΑΡ.	ΑΛΛΗΛΙΑ FY*A, FY*B,	ΑΛΛΗΛΙΑ FY*02W.01	ΥΠΟΣΥΝΟΛΟ ΑΛΛΗΛΙΩΝ FY*01 (FY*A) rs12075*G	ΥΠΟΣΥΝΟΛΟ ΑΛΛΗΛΙΩΝ FY*02 (FY*B) rs12075*A	ΥΠΟΣΥΝΟΛΟ ΑΛΛΗΛΙΩΝ FY*02W.01 rs34599082*T
		c.125G>A Fya / Fyb	c.265C>T Fyb ^{weak}			
Fya+/Fyb+	459	G/A		459	459	0
Fya-/Fyb+	321	A/A		0	708	0
	5	A/A				
	28	A/A	C/T			28
Fya+/Fyb-	196	G/G		392	0	
	3	G/A		3	3	
Fya-/Fyb-	3	A/A		0	6	
Fya+/Fybw	24	G/A	C/T	24	24	24
Fya-/Fybw	3	A/A	T/T	0	8	6
	1	A/A	C/T			1
ΣΥΝΟΛΟ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	1043			878	1208	59
ΣΥΝΟΛΟ ΑΛΛΗΛΙΩΝ FY*A, FY*B	2086					

Πίνακας 12 – Συχνότητες αλληλίων σύμφωνα με το 1000 Genome Project

ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ ΑΛΛΗΛΙΩΝ					
ΑΛΛΗΛΙΑ	ΕΥΡΩΠΗ	ΑΦΡΙΚΗ	ΑΣΙΑ E/S	ΜΕΞΙΚΑΝΟΙ ΑΜΕΡΙΚΗΣ	ΕΛΛΑΔΑ
c.125G>A rs12075*G FY*01 (FY*A)	0,398	0,019	0,923/0.640	0,461	0,420
c.125G>A rs12075*A FY*02 (FY*B)	0,602	0,981	0.077/0.360	0,539	0,580
c.265C>T rs34599082*T FY*02W.01	0,013	0,000	0.001/0.004	0,007	0,028

III. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Το αντιγονικό σύστημα Duffy, που περιγράφηκε για πρώτη φορά 70 περίπου χρόνια πριν, σε πολυμεταγγιζόμενο ασθενή με αιμολυτική νόσο, έχει από τότε απασχολήσει πολλά επιστημονικά πεδία, όπως την Ανθρωπολογία, τη Γενετική, τη Παρασιτολογία και οπωσδήποτε την Ιατρική των Μεταγγίσεων, παρά το ότι η κλινική του σημασία δεν είναι ιδιαίτερα μεγάλη, αν και ανοσογόνο.

Το ενδιαφέρον για το σύστημα Duffy αναπτύχθηκε ουσιαστικά με τη παρατήρηση ότι το πλασμώδιο της ελονοσίας *Plasmodium vivax* εισβάλλει στο ερυθροκύτταρο μέσω αυτού και κατά συνέπεια ερυθροκύτταρα αρνητικά για τα συγκεκριμένα αντιγόνα ήταν ανθεκτικά στη προσβολή τους από το παράσιτο. Μέχρι σήμερα, δεν έχει αναφερθεί άλλος ερυθροκυτταρικός υποδοχέας του πλασμωδίου, παρόλο που έχουν περιγραφεί μεμονωμένες περιπτώσεις μόλυνσης Duffy-αρνητικών ατόμων. Ο αρνητικός φαινότυπος, γνωστός ως ο επικρατής φαινότυπος των πληθυσμών της υπο-Σαχάριας Αφρικής, αποτέλεσε μια καλή εξήγηση για την προφανή απουσία του πλασμωδίου *P. vivax* στους πληθυσμούς αυτούς.

Καθώς το αντιγόνο Duffy λειτουργεί και ως υποδοχέας των χημειοκινών (DARC), παρότι οι μηχανισμοί δράσης του δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως, χρησιμοποιείται ως μία ενδιαφέρουσα παράμετρος στη μελέτη των διαφορών, που χαρακτηρίζουν ομάδες πληθυσμών, ως προς την ανθεκτικότητά τους στη προσβολή από ασθένειες, όπως αποδεικνύεται από το ρόλο του στη συνδεόμενη με φλεγμονή παθολογία και κακοήθεια, όπως επίσης και το ρόλο του, αν και αμφιλεγόμενο, στη λοίμωξη από τον ιό HIV.

Το αντιγονικό σύστημα Duffy παρουσιάζει επίσης μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της ετερογένειάς του ανάμεσα σε διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες. Πολλή από την έρευνα που αφορά το σύστημα αυτό έχει επικεντρωθεί στην εγκαθίδρυση του μοντέλου έκφρασης των παραλλαγών του ανάμεσα σε διαφορετικούς πληθυσμούς. Εύκολο στη διάγνωσή του, πολύ σύντομα αποτέλεσε μέρος του πακέτου των αντιγόνων ομάδων αίματος που συνήθως ερευνώνται με σκοπό την τυποποίηση του παγκόσμιου πληθυσμού και την εκτίμηση του επιπέδου συγγένειας ανάμεσα σε κοινότητες. Θεωρήθηκε επίσης και ως ένας δημοφιλής χρωμοσωμικός δείκτης για την αξιολόγηση των επιπτώσεων της φυσικής επιλογής σε διαφορετικές γεωγραφικές τοποθεσίες.

Τα κύρια αλλήλια που το εκφράζουν παρουσιάζουν ένα εντυπωσιακό μοτίβο γεωγραφικής διαφοροποίησης, το οποίο έχει χαρτογραφηθεί ικανοποιητικά μέσω της προσπάθειας των ερευνητών να ξεδιαλύνουν τη γενετική ιστορία του ανθρώπινου

πληθυσμού. Τα αλληλία FY^*A , FY^*B , FY^*B^{es} , από την αρχή της έρευνας, χαρτογραφήθηκαν ξεχωριστά χρησιμοποιώντας κάποια περιορισμένα δεδομένα, τα οποία έδιναν πληροφορίες για τη συχνότητα καθεμίας γενετικής παραλλαγής. Από το 1994 και μετά, προέκυψαν νέα δεδομένα, τα περισσότερα από τα οποία επωφελήθηκαν από τη πλήρη γονοτύπηση και το καθορισμό των γονοτύπων που προκύπτουν από τους συνδυασμούς των αλληλίων.

Στη παρούσα μελέτη επικεντρωθήκαμε στη μελέτη της συχνότητας των αλληλομόρφων του αντιγονικού συστήματος Duffy στον Ελληνικό πληθυσμό, λαμβάνοντας υπ' όψη και τη συχνότητα του αλληλίου που σχετίζεται με την ασθενή έκφραση του αντιγόνου Fyb.

Χίλια σαράντα τρία (1043), μη σχετιζόμενα μεταξύ τους άτομα, αξιολογήθηκαν για να ερευνηθεί ο πολυμορφισμός του συστήματος Duffy σε πληθυσμό της Ελλάδας. Η ανάλυση της συχνότητας των Duffy αλληλομόρφων δείχνει ότι στον ελληνικό πληθυσμό ο προβλεπόμενος φαινότυπος Fy(a+b+), με συχνότητα 44%, ήταν ο πιο συχνός, ακολουθούμενος από τους φαινότυπους Fy(a-b+), με συχνότητα 33,93% και Fy(a+b-), με συχνότητα 19,08%. Ο φαινότυπος Fy(a-b-) είναι πολύ σπάνιος και η συχνότητά του υπολογίστηκε 0.29%.

Η κατανομή του φαινότυπου Duffy στον ελληνικό πληθυσμό είναι ίδια με αυτήν που παρατηρείται στον καυκάσιο πληθυσμό, αλλά σημαντικά διαφορετικός από τον αφρικανικό και ασιατικό πληθυσμό όπου οι κύριοι φαινότυποι είναι οι Fy(a-b-) με συχνότητα 67% και Fy(a+b-) με συχνότητα 89,2% αντίστοιχα [18,68,79][Πίνακας 10].

Σύμφωνα με τη μελέτη μας, η συχνότητα των FY^*A αλληλομόρφων ήταν 42,09%, ενώ η συχνότητα των FY^*B αλληλομόρφων, συμπεριλαμβανομένων των αλληλομόρφων $FY^*2W.01$ και $FY^*02N.01$, ανέρχεται στο 61,5%. Σε όλη την ομάδα των 1043 ατόμων το αλληλόμορφο $FY^*01W.01$ απαντά σε συχνότητα 2,8%. Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι το αλληλόμορφο FY^*B είναι το πιο συχνό αλληλόμορφο στο σύνολο των ατόμων που ελέγξαμε. Οι συχνότητες αυτών των αλληλομόρφων καθώς και των γονοτύπων είναι όμοιες με αυτές που βρέθηκαν σε άλλους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς [18,24,68]

Το ενδιαφέρον εύρημα της μελέτης ήταν τόσο η επιβεβαίωση των συχνοτήτων των FY^*A και FY^*B στον ελληνικό πληθυσμό και η ταύτισή τους με τα αντίστοιχα δεδομένα στους Καυκάσιους, όσο και η ταυτοποίηση του $FY^*2W.01$ αλληλόμορφου, το οποίο σε ποσοστό 0,028 μας κατατάσσει στους καθαρά Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς, αφού τα ποσοστά του σε πληθυσμούς της Αφρικής, Ασίας και Μεξικάνους (Πίνακας 12) είναι σχεδόν μηδενική.

Αποδεικνύεται ότι ο ακριβής καθορισμός του γονοτύπου είναι πολύ σημαντικός, καθώς ο φαινότυπος Duffy των ερυθροκυττάρων δεν αντικατοπτρίζει πάντα τον γονότυπο Duffy. Κι αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό στη περίπτωση της ασθενούς έκφρασης του αντιγόνου Fyb (Fyb^{weak}), το οποίο οι ορολογικές μέθοδοι αδυνατούν να ανιχνεύσουν. Η μέθοδος HEA BeadChip, που χρησιμοποιήσαμε στη μελέτη μας για τη μοριακή τυποποίηση του φαινοτύπου μέσω του καθορισμού του γονοτύπου, είναι μία σχετικά εύκολη αλλά και αξιόπιστη μέθοδος, η οποία επέτρεψε την αναγνώριση, στα υπό εξέταση δείγματα, των γνωστών *FY* αλληλόμορφων: *FY**A, *FY**B, *FY**02W.01 και *FY**02N.01[39]

Μετά από προσεκτική ανάλυση όλων των στοιχείων που συλλέξαμε, πιστεύουμε ότι αυτά τα αποτελέσματα είναι συγκρίσιμα με τα αποτελέσματα που έχουν ανακοινωθεί από άλλους συγγραφείς και δεν διαφέρουν ως προς τη κατανομή των *FY* αλληλομόρφων. Παρουσιάζεται δε, ότι ο πληθυσμός των Καυκάσιων, ανεξάρτητα από τη χώρα διαμονής, χαρακτηρίζεται από σχετικά σταθερή κατανομή των *FY* αλληλομόρφων και κατά συνέπεια των Duffy γονοτύπων και φαινοτύπων. Παρόλα αυτά τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας παρέχουν καινούργια στοιχεία στην κατανομή των *FY* αλληλόμορφων και των Duffy φαινοτύπων και γονοτύπων στον καυκάσιο πληθυσμό της Ελλάδας.

Γνωρίζοντας τη σημαντικότητα του αντιγονικού συστήματος Duffy, τόσο στη μελέτη των πληθυσμών όσο και στην ιατρική, είτε λόγω της ιδιαίτερης σχέσης του με το πλασμάδιο της ελονοσίας, είτε λόγω της εμπλοκής του στη μεταγγισιοθεραπευτική πρακτική, πρέπει να αναπτυχθούν περισσότερες μελέτες που προσεγγίζουν το θέμα μέσω της μοριακής βιολογίας, ώστε να διευκρινιστούν και να χαρακτηριστούν νέοι γενετικοί πολυμορφισμοί. Αυτό θα βοηθήσει να λυθούν και να ξεκαθαριστούν τα αδιευκρίνιστα και αποκλείοντα αποτελέσματα που προκύπτουν από την εφαρμογή των κλασικών μεθόδων αιμοσυγκόλλησης. Σε συνδυασμό αυτές οι τεχνικές συμβάλλουν όχι μόνο στη διεύρυνση των γνώσεών μας αλλά και στη βελτίωση της ποιότητας των ιατρικών πρακτικών μας.

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

1. Issitt PD, Anstee DJ. Applied Blood Group Serology. 4th edition. Durham, NC: Montgomery Scientific Publications; 1998.
2. Storry JR, Castilho L, Chen Q, et al. International Society of Blood Transfusion Working Party on red cell immunogenetics and terminology: report of the Seoul and London meetings. ISBT Science Series. 2016;11:118–22.
3. Reid ME, Yazdanbakhsh K. Molecular insights into blood groups and implications for blood transfusion. *Curr Opin Hematol*. 1998;5:93–102.
4. Poole J, Daniels G. Blood group antibodies and their significance in transfusion medicine. *Transfus Med Rev*. 2007;21:58–71.
5. Coles SM, Klein HG, Holland PV. Alloimmunization in two multitransfused patient populations. *Transfusion*. 1981;21:462–6.
6. Reid ME. Overview of molecular methods in immunohematology. *Transfusion*. 2007;47:10S–6S.
7. Reid ME, Lomas-Francis C. Molecular approaches to blood group identification. *Curr Opin Hematol*. 2002;9:152–9.
8. Strauss D, Reid ME. Value of DNA-based assays for donor screening and regulatory issues. *Immunohematology*. 2008;24:175–9.
9. Reid ME. Transfusion in the age of molecular diagnostics. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:171–7.
10. Castilho L, Pellegrino J., Júnior Blood group genotyping. *ev Bras Hematol Hemoter*. 2004;26:135–40.
11. Castilho L, Rios M, Bianco C, et al. DNA-based typing of blood groups for the management of multiply-transfused sickle cell disease patients. *Transfusion*. 2002;42:232–8.
12. Flegel WA, Wagner FF, Muller TH, Gassner C. Rh phenotype prediction by DNA typing and its application to practice. *Transfus Med*. 1998;8:281–302.
13. Van der Schoot CE, Tax GH, Rijnders RJ, et al. Prenatal typing of Rh and Kell blood group system antigens: the edge of a watershed. *Transfus Med Rev*. 2003;17:31–44
14. Cutbush M, Mollison PL. The Duffy blood group system. *Heredity* 1950;4:383–9.
15. Cutbush M, Mollison PL, Parkin DM. A new human blood group. *Nature* 1950;165:188–9.
16. Ikin EW, Mourant AE, Pettenkofer JH, Blumenthal G.
17. Discovery of the expected haemagglutinin, anti-Fyb, *Nature* 1951;168:1077–8.
18. Pogo AO, Chaudhuri A. The Duffy protein: a malarial and chemokine receptor. *Semin Hematol* 2000;37:122–9.
19. Daniels G. Duffy blood group system. In: *Human blood groups*. 2nd ed. Malden, MA: Blackwell Science, 2002:324–41.
20. Chaudhuri A, Zbrzezna V, Johnson C, et al. Purification and characterization of an erythrocyte protein complex carrying Duffy blood group antigenicity. Possible receptor for *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* malaria parasite. *J Biol Chem* 1989;264:13770–4.
21. Fatima A. Aldarweesh, The Duffy Blood Group System
DOI:<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.89952>

22. Lu ZH, Wang ZX, Horuk R, et al. The promiscuous chemokine binding profile of the Duffy antigen/receptor for chemokines is primarily localized to sequences in the amino-terminal domain. *J Biol Chem* 1995;270:26239–45.
23. Waśniowska K, Blanchard D, Janvier D, et al. Identification of the Fy6 epitope recognized by two monoclonal antibodies in the N-terminal extracellular portion of the Duffy antigen receptor for chemokines. *Mol Immunol* 1996;33:917–23.
24. Olsson ML, Smythe JS, Hansson C, et al. The Fyx phenotype is associated with a missense mutation in the *Fyb* allele predicting Arg89Cys in the Duffy glycoprotein. *Br J Haematol* 1998;103:1184–91.
25. Yazdanbakhsh K, Rios M, Storry JR, et al. Molecular mechanisms that lead to reduced expression of Duffy antigens. *Transfusion* 2000;40:310–20.
26. Dracopoli NC, O’Connell P, Elsner TI, et al. The CEPH consortium linkage map of human chromosome 1. *Genomics*. 1991;9:686–700.
26. Chaudhuri A, Polyakova J, Zbrzezna V, et al. Cloning of glycoprotein D cDNA, which encodes the major subunit of the Duffy blood group system and the receptor for the *Plasmodium vivax* malaria parasite. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:10793–7.
27. Iwamoto S, Li J, Omi T, et al. Identification of a novel exon and spliced form of Duffy mRNA that is the predominant transcript in both erythroid and postcapillary venule endothelium. *Blood*. 1996;87:378–85.
28. Davis MB, Walens A, Hire R, et al. Distinct transcript isoforms of the atypical chemokine receptor 1 (ACKR1)/Duffy antigen receptor for chemokines (DARC) gene are expressed in lymphoblasts and altered isoform levels are associated with genetic ancestry and the Duffy-null allele. *PLoS One*. 2015;10:e0140098.
29. Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med*. 1976;295:302–4.
30. Schmid P, Ravenell KR, Sheldon SL, Flegel WA. DARC alleles and Duffy phenotypes in African Americans. *Transfusion*. 2012;52:1260–7.
31. Tournamille C, Colin Y, Cartron JP, Le Van Kim C. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. *Nat genet*. 1995;10:224–8.
32. Ferreira R, Ohneda K, Yamamoto M, Philipsen S. GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol Cell Biol* 2005;25:1215–27.
33. Oberdorfer CE, Kahn B, Moore V, et al. A second example of anti-Fy3 in the Duffy blood group system. *Transfusion*. 1974;14:608–11.
34. Kosinski KS, Molthan L, White L. Three examples of anti-Fy3 produced in Negroes. *Rev Fr Transfus Hemobiol*. 1984;27:619–24.
35. Mallinson G, Soo KS, Schall TJ, et al. Mutations in the erythrocyte chemokine receptor (Duffy) gene: the molecular basis of the Fya/Fyb antigens and identification of a deletion in the Duffy gene of an apparently healthy individual with the Fy(a–b–) phenotype. *Br J Haematol*. 1995;90:823–9.
36. Albrey JA, Vincent EE, Hutchinson J, et al. A new antibody, anti-Fy3, in the Duffy blood group system. *Vox Sang*. 1971;20:29–35.
37. Rios M, Chaudhuri A, Mallinson G, et al. New genotypes in Fy(a–b–) individuals: nonsense mutations (Trp to stop) in the coding sequence of either FY A or FY B. *Br J Haematol*. 2000;108:448–54.

38. Vege S, Hue-Roye K, Velliquette RW, et al. A new Duffy allele, FY*A 395G>A (p.Gly132Asp), associated with silencing Fya expression. [SP278 Abstract] *Transfusion*. 2013;53(Suppl 2):164A.
39. Lopez GH, Morrison J, Condon JA, et al. Duffy blood group phenotype-genotype correlations using high-resolution melting analysis PCR and microarray reveal complex cases including a new null FY*A allele: the role for sequencing in genotyping algorithms. *Vox Sang*. 2015;109:296–303.
40. Zimmerman PA, Woolley I, Masinde GL, et al. Emergence of FY*A(null) in a *Plasmodium vivax*-endemic region of Papua New Guinea. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:13973–7.
41. Kempinska-Podhorodecka A, Knap O, Drozd A, et al. Analysis for genotyping Duffy blood group in inhabitants of Sudan, the fourth cataract of the Nile. *Malar J*. 2012;11:115.
42. Pisacka M, Marinov I, Králová M, et al. FY*A silencing by the GATA-motif variant FY*A(–69C) in a Caucasian family. *Transfusion*. 2015;55:2616–9.
43. Chown B, Lewis M, Kaita H. The Duffy blood group system in Caucasians: evidence for a new allele. *Am J Hum Genet*. 1965;17:384–9.
44. Murphy MT, Templeton LJ, Fleming J, et al. Comparison of Fy(b) status as determined serologically and genetically. *Transfus Med*. 1997;7:135–41.
45. Castilho L, Rios M, Pellegrino J, et al. A novel FY allele in Brazilians. *Vox Sang*. 2004;87:190–5.
46. Olsson ML, Smythe JS, Hansson C, et al. The Fy(x) phenotype is associated with a missense mutation in the Fy(b) allele predicting Arg89Cys in the Duffy glycoprotein. *Br J Haematol*. 1998;103:1184–91.
47. Tournamille C, Le Van Kim C, Gane P, et al. Arg89Cys substitution results in very low membrane expression of the Duffy antigen/receptor for chemokines in Fy(x) individuals. *Blood*. 1998;92:2147–56.
48. Yazdanbakhsh K, Rios M, Storry JR, et al. Molecular mechanisms that lead to reduced expression of Duffy antigens. *Transfusion*. 2000;40:310–20.
49. Parasol N, Reid M, Rios M, et al. A novel mutation in the coding sequence of the FY*B allele of the Duffy chemokine receptor gene is associated with an altered erythrocyte phenotype. *Blood*. 1998;92:2237–43.
50. Lopez G, Condon J, Wilson B, et al. A novel FY* A allele with the 265T and 298A SNPs formerly associated exclusively with the FY* B allele and weak Fyb antigen expression: implication for genotyping interpretative algorithms. *Vox Sang*. 2015;108:52–7.
51. Davis MB, Walens A, Hire R, et al. Distinct transcript isoforms of the atypical chemokine receptor 1 (ACKR1)/Duffy antigen receptor for chemokines (DARC) gene are expressed in lymphoblasts and altered isoform levels are associated with genetic ancestry and the Duffy-null allele. *PLoS One*. 2015;10:e0140098.
52. Hamblin MT, Di Rienzo A. Detection of the signature of natural selection in humans: evidence from the Duffy blood group locus. *Am J Hum Genet*. 2002;70:284
53. Hamblin MT, Thompson EE, Di Rienzo A. Complex signatures of natural selection at the Duffy blood group locus. *Am J Hum Genet*. 2002;70:369–83.
54. Moulds JM, Hayes S, Wells TD. DNA analysis of Duffy genes in American blacks. *Vox Sang*. 1998;74:248–52.

55. Darbonne WC, Rice GC, Mohler MA, et al. Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin. *J Clin Invest*. 1991;88:1362–9.
56. Neote K, Darbonne W, Ogez J, et al. Identification of a promiscuous inflammatory peptide receptor on the surface of red blood cells. *J Biol Chem*. 1993;268:12247–9.
57. Horuk R, Colby TJ, Darbonne WC, et al. The human erythrocyte inflammatory peptide (chemokine) receptor, biochemical characterization, solubilization, and development of a binding assay for the soluble receptor. *Biochemistry*. 1993;32:5733–8.
58. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: An update. *Annual Review of Immunology*. 1997; 15:675–705.
59. Baggiolini M. Reflections on chemokines. *Immunol Rev*. 2000 Oct;177:5-7
60. Horuk R, Chitnis CE, Darbonne WC, et al. A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. *Science* 1993;261:1182–4.
61. Pruenster M, Rot A. Throwing light on DARC. *Biochem Soc Trans* 2006;34:1005–8.
62. Darbonne WC, Rice GC, Mohler MA. Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin. *J Clin Invest* 1991;88:1362–9.
63. Mayr FB, Spiel AO, Leitner JM, et al. Duffy antigen modifies the chemokine response in human endotoxemia. *Crit Care Med*. 2008;36:159–65.
64. Reich D, Nalls MA, Kao WH, et al. Reduced neutrophil count in people of African descent is due to a regulatory variant in the Duffy antigen receptor for chemokines gene. *PLoS Genet*. 2009;5:e1000360.
65. Anstee DJ. The relationship between blood groups and disease. *Blood*. 2010;115:4635–43.
66. Horne K, Woolley IJ. Shedding light on DARC: the role of the Duffy antigen/receptor for chemokines in inflammation, infection and malignancy. *Inflamm Res*. 2009;58:431–5.
67. He W, Neil S, Kulkarni H, et al. Duffy antigen receptor for chemokines mediates trans-infection of HIV-1 from red blood cells to target cells and affects HIV-AIDS susceptibility. *Cell Host Microbe*. 2008;4:52–62
68. Howes RE, Patil AP, Piel FB, et al. The global distribution of the Duffy blood group. *Nat Commun*. 2011;2:266.
69. King CL, Michon P, Shakri AR, et al. Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:8363–8.
70. Barnwell JW, Nichols ME, Rubinstein P. In vitro evaluation of the role of the Duffy blood group in erythrocyte invasion by *Plasmodium vivax*. *J Exp Med*. 1989;169:1795–802.
71. Wertheimer SP, Barnwell JW. *Plasmodium vivax* interaction with the human Duffy blood group glycoprotein: identification of a parasite receptor-like protein. *Exp Parasitol*. 1989;69:340–50.
72. Langhi DM Jr, Bordin JO. Duffy blood group and malaria. *Hematology* 2006;11:389–98.
73. Mercereau-Puijalon O, Menard D. *Plasmodium vivax* and the Duffy antigen: a paradigm revisited. *Transfus Clin Biol*. 2010;17:176–83.
74. Hedrick PW. Population genetics of malaria resistance in humans. *Heredity (Edinb)* 2011;107:283–304.

75. Kasehagen LJ, Mueller I, Kiniboro B, et al. Reduced *Plasmodium vivax* erythrocyte infection in PNG Duffy-negative heterozygotes. *PLoS One*. 2007;2:e336.
76. Cavasini CE, de Mattos LC, Couto AA, et al. Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region. *Malar J*. 2007;6:167.
77. Kasehagen LJ, Mueller I, McNamara DT, et al. Changing patterns of *Plasmodium* blood-stage infections in the wosera region of Papua New Guinea monitored by light microscopy and high throughput PCR diagnosis. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;75:588–96.
78. Michon P, Woolley I, Wood EM, et al. Duffy-null promoter heterozygosity reduces DARC expression and abrogates adhesion of the *P. vivax* ligand required for blood stage infection. *FEBS Lett*. 2001;495:111–4.
79. Gabriela Hoher, Marilu Fiegenbaum, Silvana Almeida. Molecular basis of the Duffy blood group system, Review. *Blood Transfus* 2018; 16:93-100.
80. Gunalan K, Lo E, Hostetler JB. Role of *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein 1 in invasion of Duffy-null Africans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113:6271–6.
81. Meny GM. The Duffy blood group system: a review. *Immunohematology*, vol 26, number 2, 2010
82. Klein HG, Anstee DJ. *Mollison's blood transfusion in clinical medicine*. 11th ed. Malden, MA: Blackwell Publishing, 2005.
83. Vengelen-Tyler V. Anti-Fya preceding anti-Fy3 or -Fy5: a study of five cases (abstract). *Transfusion* 1985;25:482.
84. Le Pennec PY, Rouger P, Klein MT, Robert N, Salmon C. Study of anti-Fya in five black Fy(a-b-) patients. *Vox Sang* 1987;52:246–9.
85. Geifman-Holtzman O, Wojtowycz M, Kosmas E, Artal R. Female alloimmunization with antibodies known to cause hemolytic disease. *Obstet Gynecol* 1997;89:272–5.
86. Hughes LH, Rossi KQ, Krugh DW, O'Shaughnessy RW. Management of pregnancies complicated by anti-Fy(a) alloimmunization. *Transfusion* 2007;47:1858–61.
87. Vescio LA, Fariña D, Rogido M, Sóla A. Hemolytic disease of the newborn caused by anti-Fyb. (Letter) *Transfusion* 1987;27:366.
88. Albrey JA, Vincent EE, Hutchinson J, et al. A new antibody, anti-Fy3, in the *Duffy* blood group system. *Vox Sang* 1971;20:29–35.
89. Olteanu H, Gerber D, Partridge K, Sarode R. Acute hemolytic transfusion reaction secondary to anti-Fy3. *Immunohematology* 2005;21:48–52.
90. Went R, Wright J, Webster R, Stamps R. Anti-Fy3 in sickle cell disease: a difficult transfusion problem. *Br J Haematol* 2009;144:621–2.
91. Behzad O, Lee CL, Gavin J, Marsh WL. A new antierythrocyte antibody in the Duffy system: anti-Fy4. *Vox Sang* 1973;24:337–42.
92. Colledge KI, Pezzulich M, Marsh WL. Anti-Fy5, an antibody disclosing a probable association between the Rhesus and Duffy blood group genes. *Vox Sang* 1973;24:193–9.
93. Bowen DT, Devenish A, Dalton J, Hewitt PE. Delayed haemolytic transfusion reaction due to simultaneous appearance of anti-Fya and anti-Fy5. *Vox Sang* 1988;55:35–6.
94. Chan-Shu SA. The second example of anti-Duffy5. *Transfusion* 1980;20:358–60.

95. Wasniowska K, Lisowska E, Halverson GR, Chaudhuri A, Reid ME. The Fya, Fy6 and Fy3 epitopes of the Duffy blood group system recognized by new monoclonal antibodies: identification of a linear Fy3 epitope. *Br J Haematol* 2004;124:118–22.
96. M.G. Quirino, C.M. Colli, L.C. Macedo, A.M.Sell, J.E.L Visenatainer. Methods for blood group antigens detection: cost-effectiveness analysis of phenotyping and genotyping. *Hematol, Transf. and Cell Therapy*, 2018
97. Algora M, Barbolla L, Contreras M. Naturally occurring anti-D, anti-K, anti-Fya, and anti-Leab. *Vox Sang.* 1991;61:141.
98. Marsh WL. Present status of the Duffy blood group system. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci.* 1975;5:387–412.
99. Hardman JT, Beck ML. Hemagglutination in capillaries: correlation with blood group specificity and IgG subclass. *Transfusion.* 1981;21:343–6.
100. Daniels G, Poole J, de Silva M, et al. The clinical significance of blood group antibodies. *Transfus Med.* 2002;12:287–95.
101. Goodrick MJ, Hadley AG, Poole G. Haemolytic disease of the fetus and newborn due to anti-Fy(a) and the potential clinical value of Duffy genotyping in pregnancies at risk. *Transfus Med* 1997;7:301–4.
102. Westhoff CM, Sloan SR. Molecular genotyping in transfusion medicine. *Clin Chem* 2008;54:1948–50.
103. Castilho L. The value of DNA analysis for antigens in the Duffy blood group system. *Transfusion* 2007;47(Suppl):28S–31S.
104. Peter Bugert (ed.), *Molecular Typing of Blood Cell Antigens*, *Methods in Molecular Biology*, vol. 1310, DOI 10.1007/978-1-4939-2690-9_9, © Springer Science+Business Media New York 2015
105. QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit Handbook