

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГРУППОВЫХ АНТИГЕНОВ ЭРИТРОЦИТОВ ПО СИСТЕМАМ ABO, RH И KEL СЕРОЛОГИЧЕСКИМИ ТЕСТАМИ И МЕТОДАМИ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ

Чумак А. А.^{1,*}, Белякова В. В.¹, Майорова О. А.¹, Пухликова Т. В.¹, Кравчук О. А.¹, Мишакина С. В.¹, Донская О. В.¹, Данилец В. В.²

¹ГБУЗ «Центр крови имени О. К. Гаврилова» Департамента здравоохранения города Москвы, 125284, Москва, Российская Федерация

²ГБУЗ «ГКБ имени М. П. Кончаловского» Департамента здравоохранения города Москвы, 124489, Москва, Российская Федерация

РЕЗЮМЕ

Введение. Терапия компонентами крови востребована в травматологии, терапии, гематологии, родовспоможении, трансплантологии, что определяет важность тестирования групповых систем антигенов эритроцитов в образцах крови доноров и реципиентов для обеспечения безопасности гемотрансфузий. Использование рутинных технологий для иммунологического типирования в большинстве случаев позволяет определить антигены, при исследовании которых наблюдаются слабые реакции агглютинации. Однако применение серологических методов имеет определенные ограничения, требующие использования технологий генотипирования.

Цель — оценить опыт использования серологических тестов и методов генотипирования при определении групповой принадлежности по системам ABO, RH и KEL.

Материалы и методы. Исследовали 55 489 образцов крови доноров, а также 1898 образцов крови больных. При затруднении интерпретации результата исследования (химеризм, панагглютинация, разночтение результатов) применяли методы генотипирования. Серологические исследования выполнены с помощью гелевой технологии. Выделение геномной ДНК проводили с использованием реагентов «Qiagen». Молекулярно-генетическое исследование эритроцитарных антигенов ABO, RH и KEL методом аллель-специфичной ПЦР выполняли с помощью реагентов производства BAG Diagnostics. Детекцию продуктов ПЦР осуществляли методом электрофореза в 2%-агарозном геле. Секвенирование по Сэнгеру было использовано в качестве вспомогательного метода генотипирования.

Результаты. Применение серологических методов определения антигенов эритроцитов в сочетании с методами генотипирования позволило установить групповую и резус-принадлежность 26 доноров и больных, имевших трудноопределимые группы крови.

Заключение. В случаях трудноопределимых групп крови наряду с серологическими методами исследования целесообразно использовать методы генотипирования.

Ключевые слова: антигены эритроцитов, группа крови ABO, резус-фактор, иммуногематология, серологические методы, генотипирование

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Для цитирования: Чумак А.А., Белякова В.В., Майорова О.А., Пухликова Т.В., Кравчук О.А., Мишакина С.В., Донская О.В., Данилец В.В. Идентификация групповых антигенов эритроцитов по системам ABO, RH и KEL серологическими тестами и методами генотипирования. Гематология и трансфузиология. 2021; 66(1): 37–53. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2021-66-1-37-53>

IDENTIFICATION OF ABO, RH AND KEL BLOOD GROUP ANTIGENS WITH SEROLOGY AND GENOTYPING METHODS

Chumak A. A.^{1,2}, Belyakova V. V.¹, Maiorova O. A.¹, Pukhlikova T. V.¹, Kravchuk O. A.¹, Mishakina S. V.¹, Donskaya O. V.¹, Daniletz V. V.²

¹Moscow City Blood Center named after O.K. Gavrilov, 125284, Moscow, Russian Federation

²City Clinical Hospital named after M.P. Konchalovsky, 124489, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction. Blood transfusion is a strong practice in traumatology, internal medicine, haematology, obstetrics and transplantation, which demands safety of haemotransfusion with estimating the red blood cell group antigens in donor and recipient blood. Routine immunotyping techniques usually provide for an antigen identification to weak subgroups, albeit with certain inherent limitations of serology tests that can be overcome in a genotyping approach.

Aim — performance assessment of serology and genotyping methods in the ABO, RH and KEL blood group identification.

Materials and methods. A total of 55,489 donor and 1,898 patient blood samples have been analysed. Ambiguous cases of chimerism, panagglutination and inconsistent results were tackled with genotyping. Serology tests were performed with gel cards. Whole blood DNA extraction was performed with Qiagen chemistry. Allele-specific PCR was used for the erythrocyte ABO, RH and KEL antigen genotyping with BAG Diagnostics commercial kits and a 2% agarose gel product detection. Sanger sequencing was used to complement genotyping.

Results. A combined use of serology tests and genotyping allowed a successful erythrocyte antigen-based blood group and Rh-status assignment in 26 donors and patients with ambiguous blood typing.

Conclusion. Genotyping coupled with serologic methods can be advised in a hampered blood group identification.

Keywords: erythrocyte antigens, ABO blood group, Rh-factor, immunohaematology, serology tests, genotyping.

Conflict of interest: the authors declare no conflict interest.

Financial disclosure: the study had no sponsorship.

For citation: Chumak A.A., Belyakova V.V., Maiorova O.A., Pukhlikova T.V., Mishakina S.V., Donskaya O.V., Kravchuk O.A., Daniletz V.V. Identification of ABO, RH and KEL blood group antigens with serology and genotyping methods. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2021; 66(1): 37–53 (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2021-66-1-37-53>

Введение

В иммуногематологии и клинической трансфузиологии наибольшее значение имеют системы групп крови ABO и RH, так как высокоиммуногенные антигены этих систем могут инициировать образование антител, вызывающих гемолитические реакции после переливания компонентов крови, и гемолитические заболевания у плода и новорожденного. Ген *ABO* кодирует ферменты гликозилтрансферазы, которые служат катализатором формирования антигенов А и В на мембране эритроцитов. Наиболее распространенные аллели этого гена — *ABO*Al.01*, *ABO*B.01* и *ABO*O.01* — различаются лишь несколькими однонуклеотидными

заменами в 6-м и 7-м экзонах. В дополнение к частым фенотипам ABO обнаружены многочисленные фенотипы со слабой экспрессией антигенов А или В на эритроцитах. Хотя слабые подгруппы ABO встречаются редко, именно они в большинстве случаев являются причинами возникновения затруднений и ошибок при определении группы крови ABO [1, 2].

Второй по значимости антигенной системой эритроцитов является система резус, кодируемая двумя высокоомологичными генами *RHD* и *RHCE*, при этом с антигеном D связана большая частота аллоиммунизации по сравнению с C/c- и E/e-антигенами. Одной из при-

чин ошибочного определения резус-принадлежности является существование множества вариантов антигена D. Их выявление у доноров имеет большое клиническое значение, так как они могут быть ошибочно определены как (D-) и, таким образом, стать причиной аллоиммунизации реципиентов. Разделение вариантов антигена D в современной классификации на слабые D (weak), парциальные D (partial) и D_{el} (elution) является довольно условным. По данным G. Garratty [3], 5–10 % фенотипов, первично определенных как D_{слабый}, на самом деле являются парциальными. В этой связи окончательная верификация возможна только при генетическом типировании.

Несмотря на низкую частоту распространения, редкие аллели и соответствующие им антигены систем ABO и RH могут стать причиной ложноотрицательных результатов при иммунологическом тестировании. Другими причинами, вызывающими затруднения при определении антигенов ABO и RH, являются посттрансфузионный и натуральный химеризм, наличие аутоантител и неспецифических антител, некоторые онкологические заболевания, технические ошибки.

Идентификация эритроцитарных антигенов молекулярно-генетическими методами, включая аллель-специфичную полимеразную цепную реакцию (ПЦР), исследование полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализ) и секвенирование, являются нередко единственным способом установления истинного фенотипа в случаях разночтения результатов при определении групп крови серологическими методами. С начала 2000-х годов эти методы успешно используются в практике службы крови многих стран. Работы российских исследователей последних лет также свидетельствуют о том, что методы генотипирования позволяют идентифицировать редкие аллели генов, такие как A_x, A_{el}, выявлять генотип при отрицательных результатах серологического тестирования антигенов Rh, что еще раз убеждает в необходимости более широкого использования молекулярно-генетических методов в отечественной иммуногематологии и трансфузиологии [4]. Впервые генотипирование методом аллель-специфичной ПЦР было внедрено в практику ГБУЗ «Центр крови имени О. К. Гаврилова» ДЗМ, и в представленной работе использовано в 26 случаях сомнительных результатов серологического тестирования. В качестве вспомогательного был использован метод секвенирования по Сэнгеру.

Целью настоящей работы было оценить опыт использования серологических тестов и методов генотипирования при определении групповой принадлежности по системам ABO, RH и KEL.

Материалы и методы исследования

Для исследования использовали 57 387 образцов крови, полученных от доноров ГБУЗ «Центр крови им. О. К. Гаврилова ДЗМ» и отделений перелива-

ния крови медицинских организаций ДЗМ, а также образцы крови больных, поступившие в централизованную клинко-диагностическую лабораторию для подбора эритроцитсодержащих компонентов (ЭСК) или для выполнения иммуногематологических исследований при затруднениях интерпретации результата исследования (химеризм, панагглютинация, разночтение результатов).

Серологические методы исследования. Исследование эритроцитов проводили с использованием анализатора IH-1000 и ручными методами с помощью гелевых карт ID-DiaClon ABO/D Reverse Grouping, ABD-Confirmation for Donors, Coombs Anti-IgG, Rh-Subgroups+K, Anti-A₁ Absorbed, реагента ID-DiaClon Anti-D, набора реагентов DiaMed Basic Q.C. фирмы Bio-Rad (Швейцария). Моноклональные антитела (МКА), содержащиеся в гелевых картах, включали различные линии клеток, что позволило выявлять варианты антигенов A, B и D без их дифференцировки на подгруппы. О достоверности результатов, полученных с помощью анализатора, судили на основании параллельного исследования контрольных образцов эритроцитов набора DiaMed Basic Q.C. Система идентификации анализатора IH-1000 основывалась на процессе определения комплексов «антиген — антитело». Встроенная камера анализировала изображение реакции в каждой микропробирке, а программа интерпретировала результаты реакции в гелевой карте. Система анализатора IH-1000 позволяла оценивать активность агглютинации эритроцитов от (–) до (++++). При выраженности агглютинации от (+) до (+++) результат оценивали как слабый (A/B/D_{слабый}).

Выделение ДНК. Выделение геномной ДНК для генетического типирования выполняли методом иммуномангнитной сепарации с помощью реагентов «Qiagen». Концентрацию и степень чистоты ДНК определяли на спектрофотометре. Рабочая концентрация ДНК составляла 50–100 нг/мкл, степень чистоты A260/280 — 1,7–1,9.

Генотипирование ABO, Rh и KEL. Генотипирование выполняли методом аллель-специфичной ПЦР на коммерческих наборах реагентов для выявления вариантов генов системы ABO (ABO-TYPE, ABO-TYPE Variant), вариантов системы RH (RH-TYPE (C, Cw, c, D, D_{el}, E, e), D-Partial, D-Weak)) и KEL (KKD-TYPE) фирмы BAG (Германия). Детекцию проводили посредством электрофореза в 2%-агарозном геле с последующей фиксацией результата в трансиллюминаторе.

В связи с тем, что набор для выявления вариантов генов системы ABO ограничен в спектре редких аллелей, для типирования нескольких образцов использовали метод секвенирования. Выбор праймеров и условий проведения ПЦР проводили в соответствии с рекомендациями М. Goebel и соавт. [5]. Праймеры и Мастер-микс для первичной ПЦР были изготовлены компанией ЗАО «Евроген». Реакцию секвениро-

вания проводили с использованием смеси терминирующих нуклеотидов BigDyeTerminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific) с прямым и обратным праймером в отдельных пробирках. Капиллярный электрофорез был выполнен на секвенаторе ABI 3730xl, с полимером POP-7. Последующий анализ сиквенсов выполняли в программе SeqAb и Variant Reporter. Сопоставление полученных сиквенсов с референсной последовательностью было проведено в геномном браузере Ensembl.

Результаты

Результаты серологического типирования. За семь месяцев 2020 г. серологическими методами протестировано в общей сложности 57 387 образцов крови доноров и больных. Из них 26 (0,045 %) образцов были параллельно исследованы методами генотипирования с целью уточнения их групповой и резус-принадлежности. В пяти образцах (№ 1–5, табл. 1), была определена группа $A_{\text{слабый}}$ (A_2 , Aw). Степень агглютинации эритроцитов с МКА анти-А варьировала от (±) до (++) реакция агглютинации с МКА анти- A_1 (анти- A_1) отсутствовала. Во всех пяти образцах (№ 1–5) обнаружены естественные анти-В-антитела, что еще раз подтвердило А-групповую принадлежность указанных пяти обследованных.

В двух образцах (№ 6, 7), исследованных с использованием анализатора, активность взаимодействия эритроцитов с МКА анти-А оценена как (++)/(+++), с МКА анти- A_1 исследование выполнено с помощью гелевой карты, реакцию агглютинации не наблюдали. В результате серологического тестирования выявлена группа $A_{\text{слабый}}$ В. В двух образцах крови (№ 8 и 9) в разных гелевых картах идентифицирована слабая от (–) до (++) реакция эритроцитов с МКА анти-В. Серологическими методами установлен фенотип АВ $_{\text{слабый}}$. В четырех образцах крови (№ 10–13) при исследовании с МКА анти-D IgM аналитической системой анализатора агглютинация не была выявлена. Исследование с помощью реагента ID-DiaClon анти-D IgM+IgG в непрямом антиглобулиновом тесте (НАТ) показало отрицательный результат в образцах крови № 10 и 11, и слабоположительный, (+) – (++) – в образцах № 12 и 13. Исследование антигена D в НАТ позволяет выявлять слабые и парциальные варианты антигена, в связи с этим резус-принадлежность образцов № 12 и 13 обозначили как D $_{\text{слабый/парциальный}}$.

В пяти образцах (№ 14–18) серологическими методами установлен резус-фенотип D $_{\text{слабый}}$. Идентификационная система анализатора оценила степень реакции взаимодействия эритроцитов с МКА анти-D IgM как (++) – (+++). У 5 больных (№ 19–23) идентификация эритроцитарных антигенов вызвала затруднения в связи с посттрансфузионным химеризмом. При исследовании группы крови, резус-фактора у новорожденного (№ 19), получившего трансфузии, не соответствующие его фенотипу, считавающим

устройством анализатора зафиксирована двойная популяция эритроцитов (DP), или трансфузионная химера, по 4 антигенам: D, E, e и K. В то же время в результате серологического тестирования установлен фенотип $OCcD_xE_xeK_x$. Аналогичные результаты наблюдали при тестировании образцов крови больных № 20–23: анализатором зафиксирована двойная популяция эритроцитов – химера по антигенам E, e, c и C. В двух образцах крови больных (№ 24, 25) серологическими методами установить фенотип не удалось из-за панагглютинации. При исследовании образца № 26 с помощью анализатора отмечено отсутствие реакции агглютинации с МКА анти-С, анти-с, анти-Сw, анти-Е и анти-е, методами серологического тестирования установлен фенотип С–с–D+Е–е–Сw–, лишенный антигенов *RHCE*-гена.

Результаты генотипирования. Из 7 образцов, расцененных как $A_{\text{слабый}}$ (№ 1–7), методом аллель-специфичной ПЦР в 3 случаях (№ 1, 6 и 7) был идентифицирован аллель *A2.01, соответствующий подгруппе A_2 . В 4 остальных случаях определен аллель слабого антигена А — *AW.06. В связи с тем, что используемые тест-системы для генотипирования ограничены в праймерах для определения редких аллелей гена *ABO*, исследование было дополнено секвенированием 6-го и 7-го экзонов этого гена, которое подтвердило присутствие указанного *AW.06-полиморфизма.


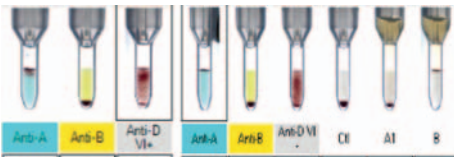
Методом аллель-специфичной ПЦР в двух образцах со слабым В (№ 8, 9) был определен генотип *A1.01/B.01, соответствующий нормальным антигенам А и В, что противоречило данным серологического тестирования. Для разрешения неоднозначности было проведено секвенирование этих образцов. В обоих случаях был выявлен консенсусный аллель *A1.01 и редкий аллель антигена В — *BW.15. В таблице 2 представлена характеристика выявленных аллелей согласно мировой базе данных однонуклеотидных полиморфизмов dbSNP Национального института биотехнологической информации США (NCBI) и проектам 1000GENOMES и ExAC [6, 7], на рисунке 1 — фрагмент сиквенса 7-го экзона образца № 9.

При определении резус-принадлежности двух образцов (№ 10, 11) с фенотипами ccdEe и CcdeeD-отрицательный статус был подтвержден выявлением нулевого аллеля *RHD**N.01(d/d). Аллели гена *RHCE**C/c/E/e подтвердили соответствующие фенотипы. Среди двух образцов, определенных как D $_{\text{слабый/парциальный}}$ и 5-и D $_{\text{слабый}}$ только у двух был выявлен аллель D $_{\text{слабый}}$ 1-го типа, во всех остальных случаях определялся нормальный аллель антигена D в гомо- или гемизиготном состоянии. В пяти образцах с химеризмом и двух образцах с панагглютинацией определение генотипа методом аллель-специфичной ПЦР не вызвало затруднений (№ 19–25, табл. 1). В результате генотипирования образца № 26 с фенотипом С–с–D+Е–е–Сw– выявлен аллель *RHD**01(D/D), при этом не обнаружены нукле-

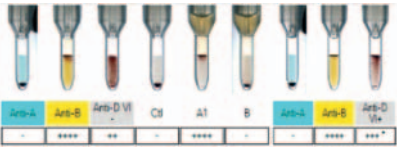
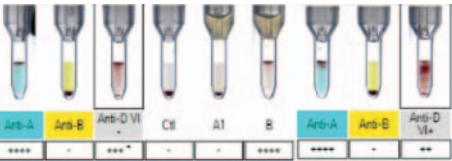
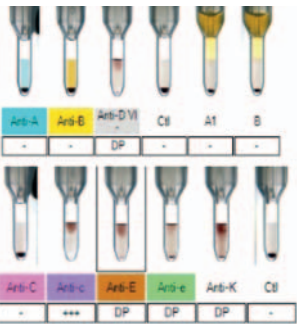
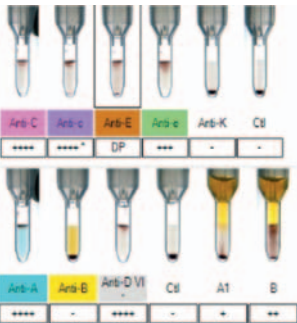
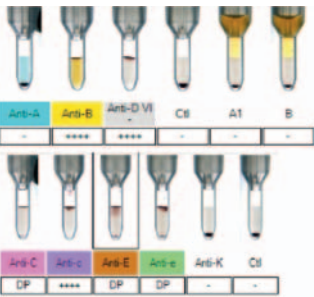
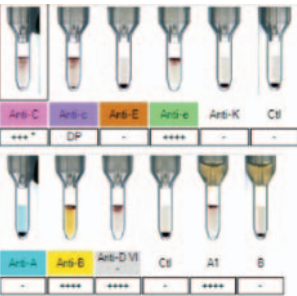
Таблица 1. Результаты исследования образцов крови методами серологического типирования и генотипирования
Table 1. Serology and genotyping-based blood profiling

Характеристика обследованного <i>Individuals data</i>		Фото гелевых карт <i>Gel cards picture</i>	Фенотип, установленный с помощью: <i>Phenotype defined by:</i>		Окончательно верифицированный фенотип <i>Final result of blood group definition</i>
№ п/п <i>pos.</i>	№ штрих-кода и статус <i>Barcode and status</i>		серологического типирования <i>serologic typing</i>	генотипирования <i>genotyping</i>	
1	047270 донор <i>donor</i>		A _{слабый} A _{weak}	*A2.01/O.01.01	A ₂
2	018713 больной <i>patient</i>		A _{слабый} A _{weak}	*AW.06/O.01.02	Aw
3	083097 донор <i>donor</i>		A _{слабый} A _{weak}	*AW.06/O.01.01	Aw
4	017759 донор <i>donor</i>		A _{слабый} A _{weak}	*AW.06/O.01.01	Aw
5	020299 больной <i>patient</i>		A _{слабый} A _{weak}	*AW.06/O.01.01	Aw
6	019739 больной <i>patient</i>		A _{слабый} B A _{weak} B	*A2.01/B.01	A ₂ B ₁
7	052850 донор <i>donor</i>		A _{слабый} B A _{weak} B	*A2.01/B.01	A ₂ B ₁
8	003142 донор <i>donor</i>		AB _{слабый} AB _{weak}	*A1.01/B.01 (аллель-специфичная ПЦР) (allele-specific PCR) *A1.01/BW.15 (секвенирование) (sequencing)	A ₁ B _w
9	019452 больной <i>patient</i>		AB _{слабый} AB _{weak}	*A1.01/B.01 (аллель-специфичная ПЦР) (allele-specific PCR) *A1.01/BW.15 (секвенирование) (sequencing)	A ₁ B _w

Продолжение табл. 1
Table 1 (continued)

Характеристика обследованного <i>Individuals data</i>		Фото гелевых карт <i>Gel cards picture</i>	Фенотип, установленный с помощью: <i>Phenotype defined by:</i>		Окончательно верифицированный фенотип <i>Final result of blood group definition</i>
№ п/п <i>pos.</i>	№ штрих-кода и статус <i>Barcode and status</i>		серологического типирования <i>serologic typing</i>	генотипирования <i>genotyping</i>	
10	057873 донор <i>donor</i>		A ccdEe	RHD*01N.01(d/d) RHCE*c/c RHCE*e/e	ccdEe
11	042135 донор <i>donor</i>		A Ccdee	RHD*01N.01(d/d) RHCE*c/c RHCE*e/e	Ccdee
12	036187 донор <i>donor</i>		OD слабый/ парциальный OD weak/partial	RHD*01(D/d)	Dd
13	033874 донор <i>donor</i>		OD слабый/ парциальный OD weak/partial	RHD*01(D/d)	Dd
14	025237 донор <i>donor</i>		AD слабый AD weak	RHD*01(D/d)	Dd
15	078765 донор <i>donor</i>		OD слабый OD weak	RHD*01(D/D)	DD
16	117442 донор <i>donor</i>		AD слабый AD weak	RHD*01(D/D)	DD

Продолжение табл. 1
Table 1 (continued)

Характеристика обследованного <i>Individuals data</i>		Фото гелевых карт <i>Gel cards picture</i>	Фенотип, установленный с помощью: <i>Phenotype defined by:</i>		Окончательно верифицированный фенотип <i>Final result of blood group definition</i>
№ п/п <i>pos.</i>	№ штрих-кода и статус <i>Barcode and status</i>		серологического типирования <i>serologic typing</i>	генотипирования <i>genotyping</i>	
17	048837 донор <i>donor</i>		B D слабый B D weak	RHD*weak D type 1	D слабый D weak 1 типа 1 type
18	060919 донор <i>donor</i>		A D слабый A D weak	RHD*weak D type 1	D слабый D weak 1 типа 1 type
19	019689 больной <i>patient</i>		O CcD _x E _x K _x k	*O.01.01/O.01.02 RHD*01(D/D) RHCE*c/c RHCE*E/E KEL*01.01/KEL*02	ccDEEKk
20	019404 больной <i>patient</i>		A CcDE _x e	RHD*01(D/D) RHCE*c/c RHCE*E/e	CcDEe
21	019541 больной <i>patient</i>		O C _x cDE _x e _x	RHD*01(D/D) RHCE*c/c RHCE*E/E	ccDEE
22	019318 больной <i>patient</i>		B Cc _x Dee	RHD*01(D/d) RHCE*c/c RHCE*E/e	CcDee

Продолжение табл. 1
Table 1 (continued)


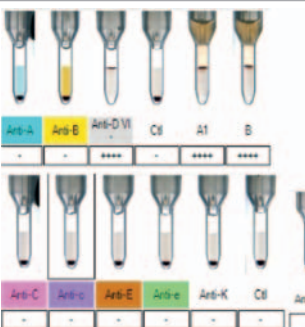
Характеристика обследованного Individuals data		Фото гелевых карт Gel cards picture	Фенотип, установленный с помощью: Phenotype defined by:		Окончательно верифицированный фенотип Final result of blood group definition
№ п/п pos.	№ штрих-кода и статус Barcode and status		серологического типирования serologic typing	генотипирования genotyping	
23	019833 больной patient		A C _x cDE _x e _x	RHD*01(D/D) RHCE*c/c RHCE*e/E	ccDEE
24	019741 больной patient	Панагглютинация, исследование невозможно Panagglutination, analysis is not possible	Группа крови по ABO и Rh не определена ABO and Rh can not be defined	*A2.01/O.01.01 RHD*01(D/D) RHCE*c/c RHCE*e/e	A ₂ CcDee
25	020102 больной patient	Панагглютинация, исследование невозможно Panagglutination, analysis is not possible	Группа крови по ABO и Rh не определена ABO and Rh can not be defined	*A1.01/B.01 RHD*01(D/d) RHCE*c/c RHCE*e/e	A ₁ B ₁ CcDdee
26	019706 donor		O –D– CcEe фенотип не определен CcEe weren't defined	RHD*01(D/D) полная делеция гена RHCE или рекомбинация с геном RHD The whole deletion of RHCE gene or recombination among RHCE and RHD genes	–D–

Таблица 2. Характеристика выявленных в настоящем исследовании редких аллелей
Table 2. Rare alleles observed in the study

Наименование аллеля Allele name	Фенотип Phenotype	Наименование однонуклеотидного полиморфизма согласно dbSNP Single nucleotide polymorphism name	Изменения нуклеотидной последовательности Changes in nucleotide sequence	Изменения аминокислотной последовательности Changes in amino acid sequence	Частота аллеля Allele frequency
ABO *AW.06	A _w	rs573234689	c.502C>G	p.Arg168Gly	0,001
ABO *BW.15	B _w	rs782058388	c.565A>G	p.Met189Val	0,000001

отидные последовательности, специфичные для аллелей C, c, E, e.

Обсуждение

За последние 20 лет строение и функции антигенных структур на эритроцитах были детально изучены благодаря развитию методов молекулярной биологии. Было продемонстрировано, что механизм появления новых аллелей связан с единичными изменениями нуклеотид-

ной последовательности генов, кодирующих антигены эритроцитов, так называемыми однонуклеотидными полиморфизмами (Single Nucleotide Polymorphism — SNP). Другими причинами являются делеции (например, делеция целого гена, наблюдаемая в случае системы RH, точечные делеции в системах групп крови ABO, KEL, Duffy, Dombrock), дубликации и вставки, образование гибридных генов в результате геноконверсии (гибриды генов RHD и RHCE) [8–12].

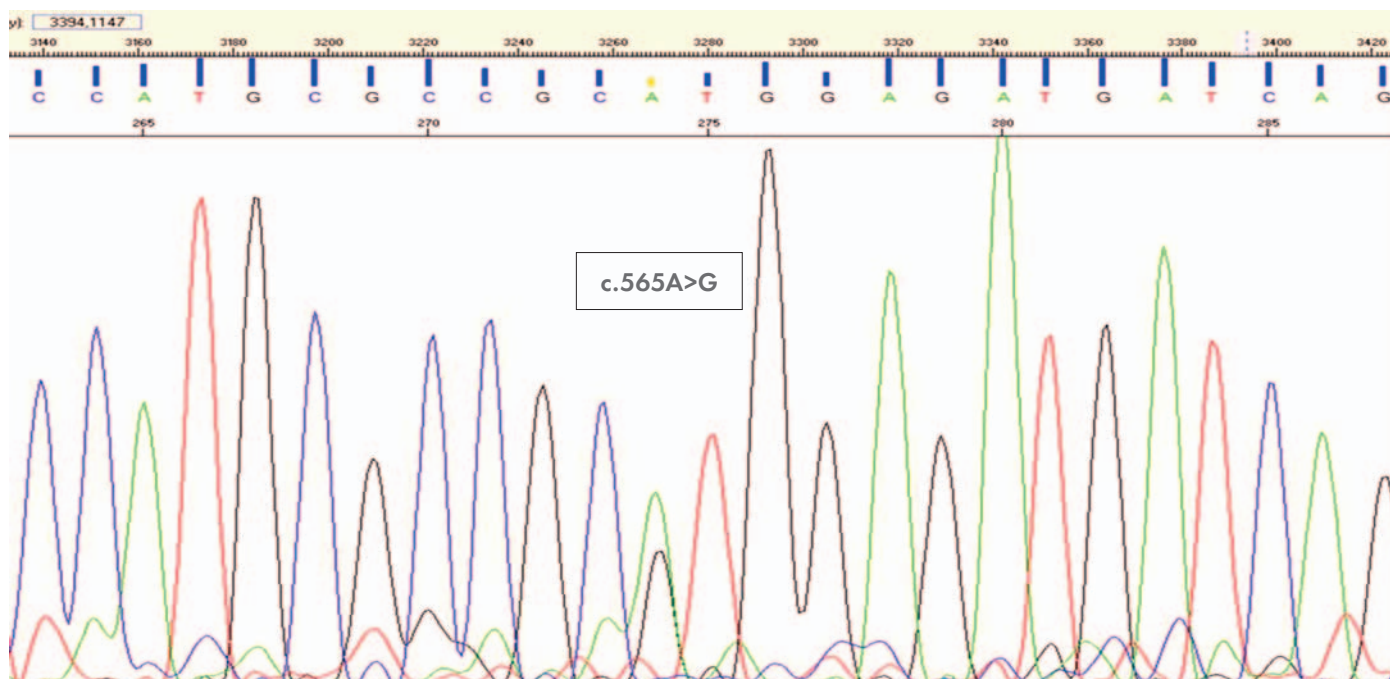


Рисунок 1. Фрагмент сиквенса 7-го экзона образца № 9. В 565-й позиции 7-го экзона аденин заменен на гуанин, что соответствует аллелю антигена В *BW.15

Figure 1. Exon 7 fragment sequence of sample No. 9, A→G substitution at position 565 discriminative of *BW.15 allele

Систематизацией знаний о генетическом разнообразии антигенов эритроцитов занимается Рабочая группа по иммуногенетике групп крови Международного общества переливания крови (ISBT Working Party), которая регулярно публикует обновления номенклатуры аллелей разных антигенов. Активное использование технологий секвенирования по Сэнгеру и секвенирования следующего поколения позволило выявить большое количество генетических вариантов антигенов эритроцитов среди разных этнических групп. Полученный опыт позволил внедрить в практику банков крови разные методы генотипирования для выявления вариантов антигенов в виде «in-house» и коммерческих тест-систем. Первая группа методов, такие как аллель-специфичная ПЦР и ПДРФ-анализ, предназначены для идентификации определенных известных полиморфизмов. Например, наборы для аллель-специфичной ПЦР представляют собой комбинацию из нескольких пар ПЦР-праймеров для поиска того или иного аллеля генов групп крови. Эффективная ПЦР с конкретной парой праймеров возможна в том случае, если соответствующий полиморфизм присутствует в генотипе обследуемого. Данным методом можно идентифицировать наиболее распространенные в конкретной популяции аллели. Для выявления крайне редких или новых вариантов используется вторая группа методов, куда входит секвенирование по Сэнгеру и секвенирование следующего поколения. Эти методы позволяют определить точную нуклеотидную последовательность исследуемого гена, поэтому не ограничены в верификации всех возможных аллелей, включая неизвестные.

В настоящей работе представлен опыт применения комбинации серологических методов, методов аллель-специфичной ПЦР и секвенирования для разрешения неоднозначностей при определении групповой принадлежности. Треть описанных затруднительных случаев связана с идентификацией антигенов А и В. Антигены А и В являются вторичными продуктами N-ацетилгалактозаминилтрансферазы (GTA) и галактозилтрансферазы (GTB). GTA и GTB катализируют перенос N-ацетил-D-галактозамина или D-галактозы на антиген H, что образует антиген А и В соответственно. Ген *ABO* расположен на длинном плече хромосомы 9q34 и состоит из семи экзонов и интронов, охватывающих примерно 20 тысяч пар оснований [10, 12]. Нуклеотидная последовательность кДНК аллеля *ABO**A1.01 состоит из 1062 пар оснований и рассматривается как консенсусный (референсный) ген, с которым сравниваются все другие варианты генов *ABO*. Подгруппа A₂ является наиболее распространенным фенотипом А после подгруппы A₁. Активность гликозилтрансферазы, кодируемой аллелем A₂, снижена в 30–50 раз по сравнению с A₁, что приводит к более слабому фенотипу А. *ABO**B.01 отличается от *ABO**A1.01 семью нуклеотидными заменами: 3 синонимичные мутации в положениях 297, 657 и 930; и 4 несинонимичные мутации в положениях 526, 703, 796 и 803 [10, 12]. Последовательность нуклеотидов аллеля *ABO**O.01, соответствующего группе О, отличается от последовательности *ABO**A1.01 единственной делецией в положении 261 экзона 6; эта делеция сдвигает рамку считывания, образуя преждевременный стоп-кодон. Таким образом, аллель О, *ABO**O.01 не проду-

цирует активный фермент, и у людей, гомозиготных по этому аллелю, антиген Н остается немодифицированным. Перечисленные выше ключевые отличия нуклеотидной последовательности от консенсусного аллеля *ABO*AI.01* используются в современных методах генотипирования для определения принадлежности к группе В и О [10].

В дополнение к основным фенотипам система АВО представлена вариантами, при которых эритроциты демонстрируют слабую агглютинацию с анти-А- и анти-В-реагентами, к примеру: A_3 , A_x , A_{finn} , A_{el} , B_3 , B_x , B_v , B_{el} , *cis*-AB [8]. Известные на сегодняшний день подгруппы объединяют разные по своей структуре аллели, несмотря на общий фенотип. Символом A_{weak} и B_{weak} , в свою очередь, обозначают слабые типы, не вошедшие ни в одну из вышеперечисленных подгрупп. Существующее многообразие аллельных вариантов антигенов А и В обусловлено либо однонуклеотидными заменами в экзонах и реже интронах гена *ABO*, либо сплайсинговыми мутациями. Последние затрагивают сайты сплайсинга или приводят к образованию новых сайтов сплайсинга в интронных областях гена, что сопровождается либо делецией смежного с мутацией экзона, либо нарушением удаления соответствующего интрона при процессинге первичного РНК-транскрипта [4]. Перечисленные мутационные изменения чаще выявляются в 6-м и 7-м экзонах гена *ABO*, ответственных за каталитический домен фермента [9]. Любые мутации в этом регионе приводят к изменению свойств гликозилтрансфераз, включая их активность, особенности переноса углеводных субстанций, соответствующих групповой специфичности (N-ацетилгалактозамина — для группы А и D-галактозы — для группы В), на конечную D-галактозу субстанции-предшественницы Н. Такие варианты гликозилтрансфераз прикрепляют меньшее количество N-ацетилгалактозамина или D-галактозы, что обуславливает ослабление экспрессии антигенов А и В на мембране эритроцитов и появление так называемых слабых фенотипов [4]. Исследования в области генетики групп крови показали, что к снижению активности гликозилтрансфераз также могут приводить нуклеотидные замены в промоторной области гена *ABO* [11].

Определение группы крови сводится к установлению наличия антигенов А и В на эритроцитах (прямая реакция) и тестирования наличия анти-А- и анти-В-антител в плазме (обратная реакция). Несоответствие результата прямой и обратной реакций вызывает затруднения в определении групповой принадлежности и требует дальнейших исследований причин этого расхождения. В случае слабой реакции эритроцитов с МКА анти-А и отрицательной реакции с МКА анти-А1 результат исследования принято относить к подгруппе A_2 , так как она является второй по рас-

пространенности после A_1 , однако этот результат может маскировать любой из редко встречающихся слабовыраженных А-антигенов [4, 13–15]. В настоящем исследовании все случаи затруднительного определения фенотипа АВО (№ 1–9) показывали промежуточную или слабую степень агглютинации эритроцитов с МКА анти-А ($\leq++$) или анти-В ($\leq++$) и предположительно относились к слабым фенотипам А и В соответственно. Отсутствие реакции агглютинации с МКА анти-А1 в образцах эритроцитов со слабой реакцией с МКА анти-А формально позволяет отнести эти образцы к подгруппе A_2 . Для уточнения результата было дополнительно проведено генотипирование методом аллель-специфичной ПЦР. Оказалось, что среди описанных в данной работе случаев слабый фенотип А был обусловлен в трех случаях аллелем **A2.01* и в четырех случаях — редким аллелем **AW.06*. Последующее секвенирование экзонов 6 и 7 подтвердило присутствие аллеля **AW.06* в указанных наблюдениях. Для этого варианта характерна замена C>G в позиции с.502, что, в свою очередь, приводит к замене аргинина глицином в позиции 168 полипептидной цепи. Результатом является снижение активности GTA и слабая экспрессия антигена А на поверхности эритроцитов.

Примером необходимости использования разных методов для установления групповой принадлежности являются образцы № 8 и 9. Серологически они были определены как АВ_{слабый}. Дальнейшее генотипирование методом аллель-специфичной ПЦР подтвердило наличие аллелей А и В, при этом В, вопреки ожиданиям, оказался нормальным аллелем **B.01*. Принимая во внимание то, что реагенты для аллель-специфичной ПЦР способны выявлять 6 основных нуклеотидных замен, специфичных для группы В в сравнении с референсной последовательностью **A1.01*, и лишь несколько дополнительных, характерных для небольшого числа редких аллелей, образцы были секвенированы. В результате исследования 6-го и 7-го экзонов для разрешения этой спорной ситуации в обоих образцах был выявлен редкий аллель **BW.15*. Его отличает от нормального аллеля замена с.565A>G и как следствие замена метионина на валин в позиции 189 аминокислотной цепи, что значительно снижает активность фермента. Сведения о распространенности обнаруженных в данной работе аллелей в России отсутствуют, однако в мире описаны несколько случаев: **AW.06* выявлен у 3 человек исследователями из Германии, у 4 — группой авторов из Ирана [16, 17], а **BW.15* упоминается в единственном источнике из Швеции [18].

По мнению большинства специалистов в области трансфузиологии, определение подгруппы антигенов А и В не имеет клинического значения, т. к. не выявлено ни одного случая посттрансфузионного осложнения, обусловленного различием донора и ре-

ципиента по подгруппе [13, 19]. Более того, даже ошибочное типирование донора как О, вместо A_w не приведет к фатальным последствиям при переливании [13]. Тем не менее, методы генотипирования в этих случаях позволяют понять причину ослабления реакции агглютинации, разрешить неоднозначность результатов серологического типирования, обеспечивают более персонализированный подход к гемокомпонентной терапии.

Клиническое значение ошибочного определения резус-принадлежности обусловлено высоким риском аллоиммунизации антигеном D. Локус *RH* представлен двумя генами — *RHD* и *RHCE*, расположенными на коротком плече 1-й хромосомы и обладающими высокой степенью гомологии как в экзонах, так и в интронах (93,8 %). Ген *RHD* кодирует антиген D, а *RHCE* — CcEe-антигены в 4 основных комбинациях (ce, cE, Ce, CE). Все они являются полипептидами, состоящими из 417 аминокислот. Каждый из полипептидов образует 12 сегментов внутри эритроцитарной мембраны и формирует 6 петель, состоящих из внеклеточной, внутримембранной и внутриклеточной частей. Аминокислоты одной или нескольких внеклеточных петель формируют линейные и конформационные эпитопы, являющиеся сайтами связывания МКА [20–22].

Фенотип D+ кодируется аллелем «дикого» типа *RHD*01*, не имеющим альтернативного аллеля, поэтому фенотип D–, как правило, является следствием делеции гена *RHD* в обеих гомологичных хромосомах, что наблюдается примерно у 17 % европеоидов. Примерно 1 % приходится на варианты антигена D с ослабленной экспрессией [21]. Понятие «слабый» антиген D относится к случаям, когда при тестировании с анти-D IgM отмечается реакция агглютинации от (+) до (+++), а «слабый/парциальный» распространяется на случаи отрицательной реакции агглютинации с анти-D IgM, но показывающие положительную реакцию при тестировании с реагентом анти-D IgM+IgG в НАТ. Многочисленные варианты генов *RHD* и *RHCE* возникают за счет однонуклеотидных замен в экзонах и интронах и, что характерно, геноконверсии между высокогомологичными генами *RHD* и *RHCE* с образованием гибридов [21]. В зависимости от молекулярно-генетических причин, лежащих в основе aberrантного фенотипа, выделяют слабые D, парциальные D и D_{el} тип, определяемый исключительно с помощью метода адсорбции-элюции. Генетические отличия слабых аллелей D от референсного *RHD*01* обуславливают аминокислотные замены во внутриклеточной, трансмембранной частях антигена D, что количественно отражается на экспрессии на клеточной мембране эритроцитов. Считается, что замены вызывают проблемы с интеграцией антигена D в мембрану эритроцитов, что может препятствовать закреплению полипептида на их цитоскелете. Следовательно, количество антиге-

на D, экспрессируемого на поверхности эритроцитов, количественно снижается, но сам антиген D остается в целом качественно неизменным [23]. Количество копий антигена D на эритроцитах у лиц со слабым типом D варьирует от 60 до 3800. У представителей европейской расы около 90 % случаев слабого D связаны с типами $D_{слабый}$ 1, 2, 3, и 4.0/4.1 [24]. Выделение подгруппы парциальных D основано на предположении, что определенные аминокислотные замены во внеклеточных петлях антигена D затрагивают линейные эпитопы, или, что более вероятно, трехмерную структуру петель [25]. Таким образом, это провоцирует качественные изменения антигена D и проявляется в виде утраты отдельных эпитопов или же формировании новых.

Известно около 20 парциальных антигенов (DII, DIII, DIV, DV, DVI, DFR, DAR, DBT и др.), которые в свою очередь делятся на подклассы. Наиболее распространенными фенотипами частичного D в Европе являются DNB, DVI и DVII [26].

В соответствии с международными стандартами Американской ассоциации банков крови, алгоритм тестирования вариантных антигенов и последующая трансфузиологическая тактика отличаются для доноров и реципиентов. Традиционно лиц с вариантным D принято рассматривать как резус-отрицательных реципиентов. Тем не менее, согласно последним рекомендациям, реципиентам и беременным женщинам со слабым D показано генотипирование для верификации варианта D [27]. Согласно опубликованным наблюдениям, реципиенты со слабым D 1-го, 2-го или 3-го типа в гомо- или гемизиготном наборе не подвержены риску образования анти-D-аллоантител при трансфузии обычных RhD-положительных эритроцитов [26, 28, 29]. Отсутствие аллоиммунизации в этих случаях связано с тем, что отдельный аллель *RHD* кодирует все эпитопы D, хотя они и присутствуют в более низкой плотности, чем на эритроцитах дикого типа. При подтверждении у реципиентов слабых D 1-го, 2-го или 3-го типа им можно безопасно переливать D-положительную кровь. Это может сэкономить до 5 % D-отрицательных ЭСК. Беременным с теми же типами слабого антигена D не рекомендовано введение антирезусного иммуноглобулина [26, 27]. Аллоиммунизация, тем не менее, наблюдается с некоторыми другими слабыми типами D, включая слабые D тип 4.2, (DAR), 11, 15, 21 и 57, поэтому правильнее относить их к частичным вариантам [26]. Среди истинно парциальных D наибольшее клиническое значение имеет DVI: обладатели данной категории продуцируют антитела к неизмененному антигену и к частичным антигенам DI – DV, DVII.

Стратегия по отношению к донорам компонентов крови иная: все потенциально иммуногенные D+ образцы эритроцитов следует относить к резус-поло-

жительным. Таким образом, у доноров важно идентифицировать истинно отрицательные и варианты D, чтобы исключить риск аллоиммунизации при последующей трансфузии ЭСК. Для выявления вариантов антигена D у доноров следует применять высокочувствительные методы с использованием реактивов на основе МКА IgG-антител в непрямом антиглобулиновом тесте, для выявления антигена DVI — реактивы на основе МКА IgM-антител (клон ESD-1M) [22, 27]. В случае неэффективности этих методов, F.F. Wagner и соавт. рекомендуют генотипирование любым доступным методом и при необходимости секвенирование для получения окончательного результата [25].

Все наблюдаемые в настоящей работе случаи выявления вариантов антигена D (№ 12–18) были представлены только донорами крови, поэтому к ним была применена соответствующая тактика серологического типирования. Как уже было сказано выше, основной задачей при обследовании доноров является верификация истинно D-негативных и D-позитивных доноров среди обладателей отрицательных и слабых фенотипов. Следует учитывать также и то обстоятельство, что моноклональные анти-D-реактивы обладают переменной реакционной способностью как с частичными, так и со слабыми типами D, поэтому они не позволяют надежно отличить частичный D от слабого D. У 4 доноров (№ 10–13) отсутствовала агглютинация при тестировании их эритроцитов с МКА анти-D IgM. Согласно нормативной документации, при получении отрицательных результатов агглютинации эритроцитов с МКА анти-D IgM исследование слабых и частичных вариантов антигена D проводят дважды в образцах крови доноров от разных донаций с использованием МКА анти-D IgM+IgG в HAT [30]. Используемая система ID-DiaClon анти-D IgM+IgG в HAT, выявляющая с 1-го по 17-й варианты слабого антигена D и ряд парциальных — DIII/DNU, DIII, DVA, DCS, DVI, DVII, DOL, DFR, DAR, DAR-E и DRH/DAU-4 — показала отрицательный результат в двух образцах (№ 10, 11) и слабopоложительный результат в двух других — № 12, 13. Это позволило сделать вывод о том, что образцы № 10 и 11 — D-отрицательные, а № 12 и 13 имеют вариант антигена D. Образцы № 10 и 11 содержали C и E антигены соответственно. Известно, что тестирование C+ и E+ доноров часто обнаруживает функциональные аллели D (нормальный D, D_{el}), т. к. D-позитивные аллели чаще наследуются с этими доминантными вариантами *RHCE* [31]. В этой связи для исключения ложноотрицательного результата образцы были протипированы методом аллель-специфичной ПЦР. Набор, которым проводилось типирование, позволял идентифицировать мутации, присущие очень слабым и негативным аллелям, включая некоторые виды *DEL*, *RHD Ψ*, *Cdel* и *RHD* (W16X). Тем не менее, результат генотипирования показал от-

сутствие гена *RHD*, что подтвердило первоначальное исследование и позволило сделать окончательное заключение о D-негативном статусе образцов № 10 и 11.

В образцах № 12 и 13 отсутствовала агглютинация эритроцитов при исследовании с МКА анти-D IgM, но наблюдалась при тестировании реагентом ID-DiaClon анти-D IgM+IgG в HAT, на основании чего результат был расценен как вариант антигена D_{слабый/парциальный}, а в пяти образцах со слабой степенью агглютинации при исследовании с МКА анти-D IgM результат оценили как D_{слабый}. Генотипирование методом аллель-специфичной ПЦР наборами D-Partial (выявляет более 30 видов частичного) и D-weak (выявляет более 15 видов слабого) позволило выявить в 2 случаях из 7 аллель *RHD*weak D type 1*, то есть слабый D 1-го типа. Он характеризуется единственной аминокислотной заменой валина на глицин в позиции 270, которая находится в трансмембранной части полипептидной цепи. Во всех остальных случаях определялся нормальный аллель D в гомозиготном или гемизиготном состоянии. Анализируя результаты исследования образцов № 12–14, следует отметить, что слабая выраженность агглютинации эритроцитов с МКА анти-D IgM и анти-D IgM+IgG в HAT, по-видимому, не связана с гемизиготным состоянием гена *RHD*, т. к. количество копий гена существенно не влияет на степень агглютинации. Наблюдаемый эффект мог быть обусловлен слабой экспрессией гена *RHD* из-за действия регуляторных механизмов или редким аллелем *RHD*, который невозможно выявить при рутинном генотипировании. Несмотря на то, что результаты генотипирования образцов № 12–16 с нормальным D могли маскировать редкий вариантный аллель, дальнейшее исследование методом секвенирования представляло бы лишь научный, но не практический интерес. Оценка результатов серологического исследования и генотипирования позволила рассматривать указанных обследованных лиц (№ 12–16) как доноров с потенциально иммуногенными вариантами D и отнести их к резус-положительным.

Наличие донорских эритроцитов в периферической крови реципиента после переливания ЭСК затрудняет его фенотипирование и представляет серьезную проблему для лаборатории. Исторически сложившаяся практика оценки фенотипа реципиента, исходя из выраженности гемагглютинации собственных и перелитых эритроцитов, объема крови больного, давности гемотрансфузии, количества перелитых ЭСК и частоты того или иного антигена в популяции, не является совершенной. В тактике подбора ЭСК, особенно при наличии трансфузионных химер, следует исключать вероятность трансфузии эритроцитов, которые могут привести к искажению антигенных маркеров и аллоиммунизации реципиента отсутствующими у него антигенами.

В настоящем исследовании сочетание серологического тестирования и генотипирования позволило в 5 случаях кровяного химеризма определить генотипы *RH* и *KEL* реципиентов и подобрать им соответствующие ЭСК.

В лабораторной практике нередко встречаются случаи, когда из-за панагглютинации невозможно определить группу крови, резус-фактор и в целом фенотип больного. Панагглютинация характеризуется способностью сыворотки больного агглютинировать стандартные эритроциты всех групп крови и свои собственные, а также способностью эритроцитов больного агглютинироваться при взаимодействии со всеми МКА. Многократное отмывание эритроцитов физиологическим раствором часто не эффективно. Генотипирование в подобных случаях позволяет установить фенотип реципиентов. В настоящей работе в двух наблюдениях фенотипы A_2CcDee и $A_1B_1CcDdee$ были установлены только посредством аллель-специфичной ПЦР, что позволило подобрать реципиентам идентичные по фенотипу ЭСК.

Особый интерес представляет результат серологического тестирования образца крови № 26. Отсутствие агглютинации с МКА анти-С, анти-с, анти-Сw, анти-Е и анти-е позволило характеризовать фенотип обследованного как $C-s-D+E-e-Cw-$, то есть лишенный антигенов *RHCE*-гена. Похожий случай выявления серологическими методами фенотипа Rh_{null} , характеризующегося отсутствием антигенов С, с, Е, е и D, был описан российскими исследователями. Однако методом генотипирования в этом образце Rh_{null} обнаружены гены *RHD* и *RHCE*, соответствующие возможному фенотипу $CcDee$, который не проявлялся серологически [32]. Поскольку подобное явление встречается крайне редко, образец был типирован методом аллель-специфичной ПЦР стандартным набором *RH-TYPE*, содержащим специфические праймеры для аллелей *RHCE*. В результате выявлен аллель *RHD*01(D/D)*, при этом не обнаружены нуклеотидные последовательности, специфичные для аллелей *C, c, E, e*, что, по всей видимости, связано с полной делецией гена *RHCE*. Частота f указанного гаплотипа крайне низкая и варьирует от 0,00005 до 0,0047, по данным разных авторов [33]. Такие больные подвержены риску аллоиммунизации против отсутствующих антигенов системы резус (С, с, Е и е) [34]. Лицам, обладающим подобным фенотипом, целесообразно рекомендовать персонифицированную заготовку ЭСК [33].

С момента разработки молекулярных методов в 1990 г. область их применения перестала ограничиваться лишь научной сферой и перешла в разряд прикладных методов. В настоящее время в лабораториях разных стран используют как методы с низкой пропускной способностью (аллель-специфичная ПЦР, ПЦР-ПДРФ), так и методики массового генотипиро-

вания (технология микрочипов, масс-спектрометрия), отличающиеся уровнем разрешения: от анализа единичных полиморфизмов до полного прочтения нуклеотидной последовательности исследуемых генов с помощью секвенирования. Кроме того, разнообразны и алгоритмы применения этих методов в практической деятельности. В нескольких крупных центрах США и Европы используют скрининг ДНК доноров в пулах по несколько образцов на предмет присутствия функциональных аллелей *RHD* для исключения возможной аллоиммунизации при последующих трансфузиях [31, 35]. Отделение трансфузионной медицины клинического центра Национального института здоровья США (National Institute of Health) в январе 2019 г. начало маркировку единиц эритроцитов доноров, первично отнесенных к D–, но затем переведенных в категорию D+ на основе молекулярного анализа фенотипа D_{el} . Это первый случай, когда в США было разрешено включать маркировку компонентов крови на основе генотипирования [36]. В Швейцарии ПЦР *RHD* (интрон 4 / экзоны 5+7 для пулов и экзоны 5, 7 и 3'UTR для тестирования по отдельности) D-отрицательных доноров является обязательным с января 2013 г., при этом НАТ с анти-D IgM+IgG был отменен [31]. Полный список рекомендаций по использованию молекулярных методов изложен в техническом руководстве Американской ассоциации банков крови. Многие практические аспекты подробно изложены в Стандартах молекулярного тестирования антигенов эритроцитов, тромбоцитов и нейтрофилов [37].

Некоторыми авторами [38, 39] выдвигались предложения по замене серологического типирования генетическим в обозримом будущем и проведение трансфузии на основе «dry-match», то есть совмещения по генотипу. Дальнейшее изучение сложных механизмов экспрессии антигенов эритроцитов и лежащего в их основе генетического разнообразия показало необоснованность такого подхода. Обнаружение новых мутаций не только в кодирующих генах групп крови, но также в промоторных и энхансерных областях этих генов, наличие других регуляторных механизмов экспрессии не позволяют рекомендовать генотипирование для тотального замещения серологических методов исследования [40].

Вместе с тем целесообразно оценить эффективность методов генотипирования и разработать стратегию их применения в службе крови. Аллель-специфичная ПЦР может быть достаточным методом в большинстве случаев при условии использования современных методов серологического тестирования. Как показывает одно из наблюдений в настоящей работе, выявление точечных мутаций в дополнение к определению специфических последовательностей аллеля *BW.15* методом секвенирования позволило объяснить расхождение результатов серологического и генетического ПЦР-

типирования, но в целом не повлияло на результат идентификации групповой принадлежности. Решение об использовании такого трудоемкого и дорогостоящего метода как секвенирование зависит от конкретного случая.

Таким образом, генотипирование для идентификации групповых антигенов может быть показано в следующих случаях:

1. несоответствие прямой и обратной реакции при определении группы крови;
2. верификация вариантов антигена D;
3. тестирование D-отрицательных лиц с доминантными аллелями *C* и *E* на предмет функциональных аллелей антигена D;

Литература

1. Javadzadeh S.H., Hayati A. Blood group discrepancies at a regional blood center. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.* 2020; 14(1): 38–44.
2. Kaur G., Kaur P., Basu S., Kaur R. Blood group discrepancies at a tertiary care centre — analysis and resolution. *Int J Lab Hematol.* 2014; 36(4): 481–7. DOI: 10.1111/ijlh.12176.
3. Garratty G. Do we need to be more concerned about weak D antigens? *Transfusion.* 2005; 45(10): 1547–51. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2005.00625.x.
4. Головкина Л.Л., Стремоухова А.Г., Пушкина Т.Д. и др. Молекулярно-генетические методы для определения групп крови эритроцитарных систем. Справочник заведующего КДЛ. 2018; 9: 46–56.
5. Goebel M., Halm-Heinrich I., Parkner A., et al. Novel ABO gene variant leads to discrepant results in forward/reverse and molecular blood grouping. *Transfus Med Hemother.* 2013; 40(6): 454–8. DOI: 10.1159/000356378.
6. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs573234689#frequency_tab
7. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs782058388#frequency_tab
8. Yip S.P. Sequence variation at the human ABO locus. *Ann Hum Genet.* 2002; 66(1): 1–27. DOI: 10.1017/S0003480001008995.
9. Olsson M.L., Chester M.A. Heterogeneity of the blood group Ax allele: Genetic recombination of common alleles can result in the Ax phenotype. *Transfus Med.* 1998; 8(3): 231–8. DOI: 10.1046/j.1365-3148.1998.00161.x.
10. Ogasawara K., Yabe R., Uchikawa M., et al. Molecular genetic analysis of variant phenotypes of the ABO blood group system. *Blood.* 1996; 88(7): 2732–7.
11. Seltam A., Das Gupta C., Bade-Doeding C., Blasczyk R. A weak blood group A phenotype caused by a translation-initiator mutation in the ABO gene. *Transfusion.* 2006; 46(3): 434–40. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2006.00740.x.
12. Storry J.R., Olsson M.L. Genetic basis of blood group diversity. *Br J Haematol.* 2004; 126(6): 759–71. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2004.05065.x.
13. Донсков С.И., Мороков В.А. Группы крови человека: Руководство по иммуносерологии. Москва: Бином; 2011: 1016 с.
14. Головкина Л.Л., Каландаров Р.С., Стремоухова А.Г. и др. Дифференциация подгрупп A_1 и A_2 антигена A системы ABO; биологическая основа и серологическая стратегия. *Гематология и трансфузиология.* 2019; 64(4): 504–15.
15. Жибурт Е.Б. Учебник. Трансфузиология. Санкт-Петербург: Питер; 2002: 736 с.
16. Seltam A., Hallensleben M., Kollmann A., Blasczyk R. The nature of diversity and diversification at the ABO locus. *Blood.* 2003; 102(8): 3035–42. DOI: 10.1182/blood-2003-03-0955.

4. получение разных результатов при определении антигенов в разных аналитических системах;

5. выявление химеризма, маскировка фактического фенотипа реципиента и отсутствие информации по его первичному определению;

6. панагглютинация.

Результаты работы свидетельствуют о целесообразности использования методов генотипирования в сложных случаях идентификации антигенов эритроцитов. Дальнейшие исследования в этой области позволят точнее охарактеризовать истинную частоту распределения редких аллелей в популяции, что, в свою очередь, обеспечит персонализированный подход к гемотрансфузиям.

References

1. Javadzadeh Javadzadeh S.H., Hayati A. Blood group discrepancies at a regional blood center. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.* 2020; 14(1): 38–44.
2. Kaur G., Kaur P., Basu S., Kaur R. Blood group discrepancies at a tertiary care centre — analysis and resolution. *Int J Lab Hematol.* 2014; 36(4): 481–7. DOI: 10.1111/ijlh.12176.
3. Garratty G. Do we need to be more concerned about weak D antigens? *Transfusion.* 2005; 45(10): 1547–51. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2005.00625.x.
4. Golovkina L.L., Stremoukhova A.G., Pushkina T.D., et al. Molecular techniques for erythrocyte antigen blood typing. *Spravochnik zavedujushhego KDL.* 2018; 9: 46–56 (In Russian).
5. Goebel M., Halm-Heinrich I., Parkner A., et al. Novel ABO gene variant leads to discrepant results in forward/reverse and molecular blood grouping. *Transfus Med Hemother.* 2013; 40(6): 454–8. DOI: 10.1159/000356378.
6. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs573234689#frequency_tab
7. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs782058388#frequency_tab
8. Yip S.P. Sequence variation at the human ABO locus. *Ann Hum Genet.* 2002; 66(1): 1–27. DOI: 10.1017/S0003480001008995.
9. Olsson M.L., Chester M.A. Heterogeneity of the blood group Ax allele: Genetic recombination of common alleles can result in the Ax phenotype. *Transfus Med.* 1998; 8(3): 231–8. DOI: 10.1046/j.1365-3148.1998.00161.x.
10. Ogasawara K., Yabe R., Uchikawa M., et al. Molecular genetic analysis of variant phenotypes of the ABO blood group system. *Blood.* 1996; 88(7): 2732–7.
11. Seltam A., Das Gupta C., Bade-Doeding C., Blasczyk R. A weak blood group A phenotype caused by a translation-initiator mutation in the ABO gene. *Transfusion.* 2006; 46(3): 434–40. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2006.00740.x.
12. Storry J.R., Olsson M.L. Genetic basis of blood group diversity. *Br J Haematol.* 2004; 126(6): 759–71. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2004.05065.x.
13. Donskov S.I., Morokov V.A. Human blood groups: an immunoserologic guide. Moscow: Binom. 2011. 1016 p. (In Russian)
14. Golovkina L.L., Kalandarov R.S., Stremoukhova A.G., et al. Distinguishing A_1 and A_2 subgroups of ABO system: biological background and serologic strategy. *Russian journal of hematology and transfusiology.* 2019; 64(4): 504–515. DOI: 10.35754/0234-5730-2019-64-4-504-515 (In Russian).
15. Zhiburt E.B. Textbook. Transfusiology. Saint-Petersburg: Piter; 2002: 736 p. (In Russian).
16. Seltam A., Hallensleben M., Kollmann A., Blasczyk R. The nature of diversity and diversification at the ABO locus. *Blood.* 2003; 102(8): 3035–42. DOI: 10.1182/blood-2003-03-0955.

17. Khorshidfar M., Chegini A., Pourfathollah A.A., et al. Establishing blood group genotyping to resolve ABO discrepancies in Iran. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2019; 35: 538–43. DOI: 10.1007/s12288-018-1044-8.
18. Hosseini-Maaf B., Hellberg A., Chester A.M., et al. Structural basis for change in activity of naturally occurring mutants of six new identified B-subgroup alleles in human ABO. *Transfusion.* 2007; 47(5): 864–75. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2007.01203.x.
19. Минеева Н.В. Основы иммуногематологии. Группы крови человека. Изд. 2-е. Санкт-Петербург; 2007: 188 с.
20. Flegel W.A. Molecular genetics and clinical applications for RH. *Transfus Apher Sci.* 2011; 44(1): 81–91. DOI: 10.1016/j.transci.2010.12.013.
21. Flegel W. The genetics of the Rhesus Blood Group system. *Blood transfusion.* 2007; 5: 50–7. DOI: 10.2450/2007.0011-07.
22. Головкина Л.Л., Стрелюхова А.Г., Пушкина Т.Д. и др. Молекулярно-серологические характеристики типов слабого антигена D системы резус. *Терапевтический архив.* 2016; 88(7): 78–83. DOI: 10.17116/terarkh201688778-83f.
23. Shao C.P., Maas J.H., Su Y.Q., et al. Molecular background of Rh D-positive, D-negative, D_{el} and weak D phenotypes in Chinese. *Vox Sang.* 2002; 83(2): 156–61. DOI: 10.1046/j.1423-0410.2002.00192.x.
24. Wagner F.F., Gassner C., Müller T.H., et al. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood.* 1999; 93(1): 385–93.
25. Wagner F.F., Frohman A., Flegel W.A. RHD positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genet.* 2001; 2: 10. DOI: 10.1186/1471-2156-2-10.
26. Sandler S.G., Flegel W.A., Westhoff C.M., et al.; College of American Pathologists Transfusion Medicine Resource Committee Work Group. It's time to phase in RHD genotyping for patients with a serologic weak D phenotype. *Transfusion.* 2015; 55(3): 680–9. DOI: 10.1111/trf.12941.
27. Levitt J., ed. Standards for blood banks and transfusion service. 29th ed. American Association of Blood Banks; Bethesda, MD: 2014. <http://www.aabb.org/sa/standards/Pages/standards-resources.aspx>.
28. Flegel W.A. How I manage donors and patients with a weak D phenotype. *Curr Opin Hematol.* 2006; 13: 476–83. DOI: 10.1097/01.moh.0000245694.70135.c3.
29. Pham B.N., Roussel M., Peyrard T., et al. Anti-D investigations in individuals expressing weak D Type 1 or weak D Type 2: allo- or autoantibodies? *Transfusion.* 2011; 51(12): 2679–85. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2011.03207.x.
30. Постановление Правительства РФ от 22 июня 2019 г. № 797 «Об утверждении Правил заготовки, хранения, транспортировки и клинического использования донорской крови и ее компонентов и о признании утратившими силу некоторых актов Правительства Российской Федерации».
31. Wagner F.F. RHD PCR of D-Negative Blood Donors. *Transfus Med Hemother.* 2013; 40(3): 172–81. DOI: 10.1159/000351604.
32. Головкина Л.Л., Стрелюхова А.Г., Пушкина Т.Д. и др. Первый случай выявления фенотипа Rh_{null} системы Резус в России. *Справочник заведующего КДЛ.* 2015; 10: 14–20.
33. Flatt J.F., Musa R.H., Ayob Y., et al. Study of the D phenotype reveals erythrocyte membrane alterations in the absence of RHCE. *Br J Haematol.* 2012; 158: 262–73. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2012.09149.x.
34. Pour M.S.S., Soleimany S., Ghasemimehr N., et al. A case report of a rare Rh phenotype: D–. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2019; 35: 402–4. DOI: 10.1007/s12288-019-01089-7.
35. Denomme G.A. Prospects for the provision of genotyped blood for transfusion. *Br J Haematol.* 2013; 163: 3–9. DOI: 10.1111/bjh.12476.
36. Flegel W.A., Wagner F.F. DEL. *Blood Transfus.* 2020; 18(3): 159–62. DOI: 10.2450/2020.0296-19.
17. Khorshidfar M., Chegini A., Pourfathollah A.A., et al. Establishing blood group genotyping to resolve ABO discrepancies in Iran. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2019; 35: 538–43. DOI: 10.1007/s12288-018-1044-8.
18. Hosseini-Maaf B., Hellberg A., Chester A.M., et al. Structural basis for change in activity of naturally occurring mutants of six new identified B-subgroup alleles in human ABO. *Transfusion.* 2007; 47(5): 864–75. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2007.01203.x.
19. Mineeva N.V. Fundamentals of immunohaematology. Human blood groups. 2nd edition. Saint-Petersburg. 2007. 188 p. (In Russian).
20. Flegel W.A. Molecular genetics and clinical applications for RH. *Transfus Apher Sci.* 2011; 44(1): 81–91. DOI: 10.1016/j.transci.2010.12.013.
21. Flegel W. The genetics of the Rhesus Blood Group system. *Blood transfusion.* 2007; 5: 50–7. DOI: 10.2450/2007.0011-07.
22. Golovkina L.L., Stremoukhova A.G., Pushkina T.D., et al. Molecular and serologic traits of weak antigen D types in Rhesus system. *Terapevticheskiy arkhiv.* 2016; 88(7): 78–83. DOI: 10.17116/terarkh201688778-83f (In Russian).
23. Shao C.P., Maas J.H., Su Y.Q., et al. Molecular background of Rh D-positive, D-negative, D_{el} and weak D phenotypes in Chinese. *Vox Sang.* 2002; 83(2): 156–61. DOI: 10.1046/j.1423-0410.2002.00192.x.
24. Wagner F.F., Gassner C., Müller T.H., et al. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood.* 1999; 93(1): 385–93.
25. Wagner F.F., Frohman A., Flegel W.A. RHD positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genet.* 2001; 2: 10. DOI: 10.1186/1471-2156-2-10.
26. Sandler S.G., Flegel W.A., Westhoff C.M., et al.; College of American Pathologists Transfusion Medicine Resource Committee Work Group. It's time to phase in RHD genotyping for patients with a serologic weak D phenotype. *Transfusion.* 2015; 55(3): 680–9. DOI: 10.1111/trf.12941.
27. Levitt J., ed. Standards for blood banks and transfusion service. 29th ed. American Association of Blood Banks; Bethesda, MD: 2014. <http://www.aabb.org/sa/standards/Pages/standards-resources.aspx>.
28. Flegel W.A. How I manage donors and patients with a weak D phenotype. *Curr Opin Hematol.* 2006; 13: 476–83. DOI: 10.1097/01.moh.0000245694.70135.c3.
29. Pham B.N., Roussel M., Peyrard T., et al. Anti-D investigations in individuals expressing weak D Type 1 or weak D Type 2: allo- or autoantibodies? *Transfusion.* 2011; 51(12): 2679–85. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2011.03207.x.
30. Decree of the Government of the Russian Federation No. 797 of 22 June, 2019, "On approval of the rules for procurement, storage, transportation and clinical use of donor blood and its components and on expiration of certain acts of the Government of the Russian Federation". (In Russian).
31. Wagner F.F. RHD PCR of D-negative blood donors. *Transfus Med Hemother.* 2013; 40(3): 172–81. DOI: 10.1159/000351604.
32. Golovkina L.L., Stremoukhova A.G., Pushkina T.D., et al. First observation of Rhnull Rh-phenotype in Russia. *Spravochnik zavedujushago KDL.* 2015; 10: 14–200 (In Russian).
33. Flatt J.F., Musa R.H., Ayob Y., et al. Study of the D phenotype reveals erythrocyte membrane alterations in the absence of RHCE. *Br J Haematol.* 2012; 158: 262–73. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2012.09149.x.
34. Pour M.S.S., Soleimany S., Ghasemimehr N., et al. A case report of a rare Rh phenotype: D–. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2019; 35: 402–4. DOI: 10.1007/s12288-019-01089-7.
35. Denomme G.A. Prospects for the provision of genotyped blood for transfusion. *Br J Haematol.* 2013; 163: 3–9. DOI: 10.1111/bjh.12476.
36. Flegel W.A., Wagner F.F. DEL. *Blood Transfus.* 2020; 18(3): 159–62. DOI: 10.2450/2020.0296-19.

37. Standards for molecular testing for red cell, platelet, and neutrophil antigens. 5th ed. American Association of Blood Banks; Bethesda, MD: 2020. <http://www.aabb.org/sa/standards/Pages/standards-resources.aspx>.
38. Denomme G.A., Flegel W.A. Applying molecular immunohematology discoveries to standards of practice in blood banks: Now is the time. *Transfusion*. 2008; 48(11): 2461–75. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2008.01855.x.
39. van der Schoot C.E., Veldhuisen B., de Haas M. Will genotyping replace serology in future routine blood grouping? – Opinion 5. *Transfus Med Hemother*. 2009; 36(3): 234–5. DOI: 10.1159/000214840.
40. Reid M.E., Denomme G.A. DNA-based methods in the immunohematology reference laboratory. *Transfus Apher Sci*. 2011; 44(1): 65–72. DOI: 10.1016/j.transci.2010.12.011.

Информация об авторах

Чумак Анна Александровна*, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией HLA-типирования, ГБУЗ «Центр крови им. О. К. Гаврилова» Департамента здравоохранения города Москвы, e-mail: gella5@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5912-3564>

Белякова Вера Владимировна, кандидат биологических наук, заведующая централизованной клинико-диагностической лабораторией ГБУЗ «Центр крови им. О. К. Гаврилова» Департамента здравоохранения города Москвы, e-mail: karnas@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8954-1281>

Майорова Ольга Андреевна, доктор медицинских наук, профессор, главный врач, ГБУЗ «Центр крови им. О. К. Гаврилова» Департамента здравоохранения города Москвы, e-mail: olgamai@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8589-7122>

Пухликова Татьяна Владимировна, кандидат биологических наук, биолог лаборатории HLA-типирования, ГБУЗ «Центр крови им. О. К. Гаврилова» Департамента здравоохранения города Москвы, e-mail: ptv-mos@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9875-0085>

Мишакина Светлана Владимировна, врач клинической лабораторной диагностики Централизованной клинико-диагностической лаборатории, ГБУЗ «Центр крови им. О. К. Гаврилова» Департамента здравоохранения города Москвы, e-mail: svetlanamishakina772@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7354-2383>

Донская Ольга Владимировна, врач клинической лабораторной диагностики Централизованной клинико-диагностической лаборатории, ГБУЗ «Центр крови им. О. К. Гаврилова» Департамента здравоохранения города Москвы, e-mail: o.v.donskaya.126@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3053-7987>

37. Standards for molecular testing for red cell, platelet, and neutrophil antigens. 5th ed. American Association of Blood Banks; Bethesda, MD: 2020. <http://www.aabb.org/sa/standards/Pages/standards-resources.aspx>.
38. Denomme G.A., Flegel W.A. Applying molecular immunohematology discoveries to standards of practice in blood banks: Now is the time. *Transfusion*. 2008; 48(11): 2461–75. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2008.01855.x.
39. van der Schoot C.E., Veldhuisen B., de Haas M. Will genotyping replace serology in future routine blood grouping? – Opinion 5. *Transfus Med Hemother*. 2009; 36(3): 234–5. DOI: 10.1159/000214840.
40. Reid M.E., Denomme G.A. DNA-based methods in the immunohematology reference laboratory. *Transfus Apher Sci*. 2011; 44(1): 65–72. DOI: 10.1016/j.transci.2010.12.011.

Information about the authors

Anna A. Chumak, Cand. Sci. (Med.), Head of the Laboratory for HLA-typing, Moscow City Blood Center named after O. K. Gavrillov, e-mail: gella5@mail.ru, tel.+7(903)565-49-92
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5912-3564>

Vera V. Belyakova, Cand. Sci. (Biol.), Head of the Central Clinical Diagnostic Laboratory, Moscow City Blood Center named after O. K. Gavrillov, e-mail: karnas@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8954-1281>

Olga A. Maiorova, Dr. Sci. (Med.), Professor, CEO, Moscow City Blood Center named after O. K. Gavrillov, e-mail: olgamai@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8589-7122>

Tatiana V. Pukhlikova, Cand. Sci. (Biol.), Researcher (biology), Laboratory for HLA-typing, Moscow City Blood Center named after O. K. Gavrillov, e-mail: ptv-mos@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9875-0085>

Svetlana V. Mishakina, Physician (clinical laboratory diagnostics), Central Clinical Diagnostic Laboratory, Moscow City Blood Center named after O. K. Gavrillov, e-mail: svetlanamishakina772@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7354-2383>

Olga V. Donskaya, Physician (clinical laboratory diagnostics), Central Clinical Diagnostic Laboratory, Moscow City Blood Center named after O.K. Gavrillov, e-mail: o.v.donskaya.126@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3053-7987>

Кравчук Ольга Алексеевна, врач Централизованной клинко-диагностической лаборатории, ГБУЗ «Центр крови им. О. К. Гаврилова» Департамента здравоохранения города Москвы,
e-mail: key900@yandex.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1782-284x>

Данилец Виолетта Вячеславовна, заведующая отделением трансфузиологии ГБУЗ «ГКБ им. М. П. Кончаловского» Департамента здравоохранения города Москвы,
e-mail: gb3opk@yandex.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4605-8315>

*** Автор, ответственный за переписку**

Поступила: 17.11.2020

Принята в печать: 12.01.2021

Olga A. Kravchuk, Physician, Central Clinical Diagnostic Laboratory, Moscow City Blood Center named after O. K. Gavrillov,
e-mail: key900@yandex.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1782-284x>

Violetta V. Daniletz, Head of the Department of Transfusiology, City Clinical Hospital named after M.P. Konchalovsky,
e-mail: gb3opk@yandex.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4605-8315>

*** Corresponding author**

Received 17.11.2020

Accepted 12.01.2021