

Генотипирование групп крови эритроцитов для пациентов с множественными трансфузиями

Наталья Витальевна Минеева, Ирина Ивановна Кробинец*,
Светлана Викторовна Гавровская, Наталия Николаевна Бодрова,
Елена Анатольевна Сысоева, Александр Викторович Чечёткин,
Станислав Семёнович Бессмельцев

Российский научно-исследовательский институт гематологии
и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства,
г. Санкт-Петербург, Россия

Реферат

Цель. Оценить возможность применения молекулярно-генетического типирования эритроцитов у реципиентов, получавших трансфузии в течение 3 мес.

Методы. В исследование были включены образцы крови 95 пациентов, получивших 3 или более трансфузий эритроцитов в течение 3 мес. Пациенты имели следующие диагнозы: β -талассемия ($n=4$), апластическая анемия ($n=5$), множественная миелома ($n=7$), неходжкинские лимфомы ($n=11$), хронический миелолейкоз ($n=16$), первичный миелофиброз ($n=9$), миелодиспластический синдром ($n=22$), острый лейкоз ($n=21$). Генотипирование антигенов эритроцитов проводили методом гемагглютинации в гелевых картах DiaClon Rh-Subgroups+K. Генотипирование Rh, Kell осуществляли с помощью наборов SSP-PCR RBC — FluoGene vERYfy (Inno-train Diagnostik, Германия). Проведено генотипирование стандартных аллелей *RHD/RHCE*, а также полиморфизмов, связанных с *KEL1/KEL2* [T698C (Met198Thr)] гена *KEL*.

Результаты серологического и молекулярно-генетического типирования групп крови RhCE и Kell у доноров совпадали на 100%, в то время как в исследуемых образцах крови пациентов расхождение составило 45,3%. Расхождения по антигенам системы Rh зарегистрированы у 41 больного: по одному антигену системы Rh — у 30 пациентов, по двум — у 9 человек. 10 пациентов, фенотип которых определялся как RhCc, были генотипированы как *RHCE*CC*. 2 пациента, которые были фенотипированы как Rhee, имели генотип *RHCE*EE*. У 2 человек антигены D и C не выявлялись в фенотипе, но были обнаружены в генотипе. Расхождения по антигену K зафиксировано у 2 пациентов, причём антиген отсутствовал в фенотипе, но присутствовал в генотипе. Результаты генотипирования были подтверждены серологическим исследованием при последующих госпитализациях.

Вывод. Генотипирование служит полезным дополнением к традиционным методам в тех случаях, когда серологическое типирование ограничено.

Ключевые слова: системы антигенов эритроцитов Rh и Kell, генотипирование групп крови эритроцитов, гематологические заболевания, множественные трансфузии, доноры.

Для цитирования: Минеева Н.В., Кробинец И.И., Гавровская С.В., Бодрова Н.Н., Сысоева Е.А., Чечёткин Е.А., Бессмельцев С.С. Генотипирование групп крови эритроцитов для пациентов с множественными трансфузиями. *Казанский мед. ж.* 2021; 102 (5): 621–625. DOI: 10.17816/KMJ2021-621.

Blood group genotyping in multi-transfused patients

N.V. Mineeva, I.I. Krobinec, S.V. Gavrovskaya, N.N. Bodrova, E.A. Sisoeva, A.V. Chechetkin, S.S. Bessmeltsev
Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology Federal medical biological agency,
Saint Petersburg, Russia

Abstract

Aim. To assess the possibility of using blood group genotyping in recipients who received transfusions for 3 months.

Methods. The study included blood samples from 95 patients who received 3 or more erythrocyte transfusions

within 3 months. The patients had the following diagnoses: multiple myeloma (n=7), beta thalassemia (n=4), non-Hodgkin's lymphomas (n=11), chronic myeloid leukemia (n=16), primary myelofibrosis (n=9), myelodysplastic syndrome (n=22), acute leukemia (n=21), aplastic anemia (n=5). Red blood cells phenotyping was performed in Diaclon Rh Subgroups+K Gel Cards. The Rh and Kell genotyping was performed by using RBC SSP-PCR kits — FluoGene vERYfy (Inno-train Diagnostics, Germany). The standard RHD/RHCE alleles, as well as polymorphisms associated with KEL1/KEL2 [T698C (Met198Thr)] of the KEL gene were genotyped.

Results. The concordance rate between serological and molecular genetic typing of RhCE and Kell blood groups for donors was 100%, while the patient's results were discordant in 45.3% of cases. Discrepancies in antigens of the Rh system were registered in 41 patients: one antigen of the Rh system — in 30 patients, two — in 9 patients. Ten patients who had been previously phenotyped as RhCc were genotyped as *RHCE*CC*. 2 patients who had been previously phenotyped as Rhee were genotyped as *RHCE*EE*. In 2 patients, antigens D and C were not detected in the phenotype but were identified in the genotype. Discrepancies in antigen K were recorded in 2 patients, and the antigen was absent in the phenotype but was present in the genotype. The genotyping results were confirmed by serological typing at subsequent hospitalizations.

Conclusion. Blood group genotyping is a useful adjunct to traditional methods when serological typing is limited.

Keywords: RHCE and Kell blood group systems, blood group genotyping, hematological diseases, multi-transfused patients, donors.

For citation: Mineeva N.V., Krobinets I.I., Gavrovskaya S.V., Bodrova N.N., Sisoeva E.A., Chechetkin A.V., Bessmeltsev S.S. Blood group genotyping in multi-transfused patients. *Kazan Medical Journal*. 2021; 102 (5): 621–625. DOI: 10.17816/KMJ2021-621.

Актуальность. Проведение гемокомпонентной терапии пациентам с гемобластомами и депрессиями кроветворения часто осложнено наличием в кровотоке реципиента популяции донорских эритроцитов от предыдущей трансфузии (трансфузионный химеризм), что не позволяет проводить точное фенотипирование групп крови, если тестирование не было выполнено до начала трансфузий. Трансфузии компонентов донорской крови, несущих отсутствующие у реципиента антигены, повышают риск аллоиммунизации. Формирование клинически значимых аллоантител повышает риск развития посттрансфузионных реакций гемолитического типа при последующей трансфузии. Наличие у реципиентов аллоантител ещё больше задерживает процесс поиска совместимых единиц эритроцитов, которые не несут соответствующие антигены. Кроме того, аллоиммунизация сокращает выживаемость перелитых эритроцитов и увеличивает потребность в трансфузиях, которые в конечном итоге повышают нагрузку железом на организм [1–7].

Уровень аллоиммунизации у гематологических больных по разным данным составляет от 1,0 до 3,2%, а у больных серповидноклеточной анемией может достигать 43%. Наиболее часто встречаются антитела против антигенов систем Rh и Kell. Несмотря на то обстоятельство, что переливание идентичных по фенотипу Rh и Kell, в дополнение к АВ0 и RhD, гемокомпонентов значительно снизило частоту аллоиммунизации, этот риск не был полностью устранён в случае множественных трансфузий [8–11].

За последнее десятилетие ряд исследователей указали на преимущества генотипирования группы крови для таких больных, так как между фенотипированием и генотипированием часто обнаруживают несоответствия [12–14].

Цель. Оценить возможность применения молекулярно-генетического типирования генов эритроцитов у реципиентов, получавших трансфузии в течение 3 мес.

Материал и методы исследования. В исследование были включены образцы крови 95 пациентов, проходивших лечение в ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства» (РосНИИГТ ФМБА). Все пациенты получили 3 и/или более трансфузий эритроцитов в течение 3 мес. Всеми участниками было подписано информированное согласие на участие в исследовании и согласие на забор крови.

На проведение исследования было получено разрешение локального этического комитета ФГБУ РосНИИГТ ФМБА (протокол №40 от 13 мая 2021 г.).

Пациенты имели следующие диагнозы: β-талассемия (n=4), апластическая анемия (n=5), множественная миелома (n=7), неходжкинские лимфомы (n=11), хронический миелолейкоз (n=16), первичный миелофиброз (n=9), миелодиспластический синдром (n=22), острый лейкоз (n=21). Фенотипирование проводили методом гемагглютинации в гелевых картах DiaClon Rh-Subgroups+K в соответствии с инструкциями производителя (BIO-RAD, Швейцария).

Геномная дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) была получена с помощью набора реагентов ДНК-сорб-В (Россия) из 9 мл периферической венозной крови, взятой в полиэтиленовые пробирки, содержащие 1 мл 0,5 М этилендиаминтетрауксусной кислоты. Процесс выделения ДНК осуществляли согласно инструкции производителя. Концентрацию ДНК в каждом образце определяли с помощью измерений оптической плотности при 260 и 280 нм. Для полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали 50–100 нг ДНК.

Генотипирование Rh, Kell проводили с помощью наборов SSP-PCR RBC — FluoGene vERYfy (Inno-train Diagnostik, Германия). Наборы состоят из ПЦР-планшетов с ячейками, содержащими предварительно помещённые в них и высушенные реакционные смеси, содержащие аллель-специфические праймеры, праймеры внутреннего контроля и нуклеотиды. Мастер-микс был приготовлен из 10X ПЦР-буфера, раствора ДНК, Таq-полимеразы и дистиллированной воды. Параметры амплификации были использованы в соответствии с инструкцией производителя. Продукты амплификации были оценены с помощью программного обеспечения FluoVista. Проведено молекулярно-генетическое типирование стандартных аллелей *RHD/RHCE* и аллеля *C^w*, а также полиморфизмов, связанных с *KEL1/KEL2* [T698C (Met198Thr)] гена *KEL*.

Результаты и обсуждение. Сравнение результатов серологического и молекулярно-

Таблица 1. Результаты серологического и молекулярно-генетического типирования групп крови больных, получивших 3 и/или более трансфузий эритроцитов в течение 3 мес

Обследовано больных, n	Соответствие фенотипа генотипу, n (%)	Несоответствие фенотипа генотипу, n (%)
95	52 (54,7%)	43 (45,3%)

генетического типирования групп крови RhCE и Kell показало, что среди доноров крови и её компонентов результаты совпадали на 100% (10/10), в то время как в исследуемых образцах крови ранее наблюдавшихся в учреждении пациентов отмечены расхождения (табл. 1).

Так, расхождения по антигенам системы Rh и Kell зарегистрированы у 43 больных (табл. 2).

Расхождение по одному антигену системы Rh выявлено у 30 пациентов, по двум антигенам — у 9 человек. Результаты обследования 39 пациентов показали трансфузионный химеризм: наличие антигенов C, c, E, e в фенотипе и отсутствие в генотипе, что свидетельствует о трансфузиях неидентичных по антигенам системы Rh гемокомпонентов.

Обращает на себя внимание высокая частота несоответствия по антигену c, который обладает высокой иммуногенностью. 10 пациентов, фенотип которых определялся как RhCc, были генотипированы как *RHCE*CC*, что приводило к необходимости поиска с-отрицательных единиц эритроцитов. У таких пациентов высока вероятность аллоиммунизации.

Таблица 2. Расхождения результатов серологического и молекулярно-генетического типирования групп крови RhCE и Kell у больных

Система антигенов	Антиген, по которому выявлено расхождение	Число больных с расхождением по антигенам, n (%)	Фенотип, n	Генотип, n
Rh	C	11 (11,5)	Cx*cEe (7)	ccEe (7)
			Cx*cEe (1)	ccEe (1)
			Cx*cEE (3)	ccEE (3)
	E	9 (9,5)	CcEx*e (5)	CcEe (5)
			CCEx*e (4)	CCeE (4)
	c	9 (9,5)	Ccx*ce (4)	CCeE (4)
			Ccx*Ee (5)	CCeE (5)
	cE	4 (4,2)	Ccx*Ex*e (4)	CCeE (4)
	e	3 (3,2)	CcEex* (1)	CcEE (1)
			ccEex* (2)	ccEE (2)
Kell	Ce	2 (2,1)	Cx*cEex* (2)	ccEE (2)
	CE	1 (1,1)	Cx*cEx*e (1)	ccEe (1)
	DC	2 (2,1)	ccdee (2)	CcDee (2)
	K	2 (2,1)	CcEeK- (2)	CcEeK+ (2)

Примечание: х (химера) — двойная популяция эритроцитов.

Аналогично 2 пациента, которые были фенотипированы как Rhee, имели генотип *RHCE*EE*, что требовало поиска е-отрицательных единиц эритроцитов. У 2 человек антигены D и C не выявлены в фенотипе, но определены в генотипе. Данные пациенты страдали хроническим миелолейкозом и миелодиспластическим синдромом, и отсутствие в фенотипе указанных антигенов свидетельствовало о потере экспрессии антигенов эритроцитами. У 1 пациента потеря экспрессии носила кратковременный характер и восстановилась после терапии. У второго, ранее наблюдавшего пациента потеря экспрессии была связана с развитием терминального рецидива с последующим летальным исходом.

Расхождения по антигену K зафиксировано у 2 пациентов, причём антиген отсутствовал в фенотипе, но присутствовал в генотипе. Полученные расхождения связаны с высокой трансфузионной активностью (18 и 22 дозы эритроцитной взвеси соответственно) у пациентов, получавших трансфузии эритроцитарных компонентов, не содержащих антиген K системы Kell.

Все последующие трансфузии компонентов крови пациенты получали с учётом генотипа системы Rh. В результате трансфузий гемолитических реакций и осложнений зафиксировано не было. Результаты молекулярно-генетического типирования были подтверждены серологическим исследованием при последующих госпитализациях.

Наши данные показали высокую согласованность результатов между двумя методами исследования для доноров крови (100%). Однако, как и ожидалось, в группе пациентов зарегистрированы многочисленные противоречивые результаты для RhCE и Kell.

Полученные нами данные согласуются с результатами других исследований, в которых расхождения между результатами генотипирования и фенотипирования колебались от 10 до 90% у пациентов, получавших трансфузии компонентов крови [14–16]. Так, в 1999 г. T.G. Legler и соавт. оценили применение молекулярно-генетических методов типирования групп крови системы Rh у трансфузионно-зависимых больных. В 2 из 27 случаев фенотипически D-негативные пациенты по результатам генотипирования оказались D-позитивными; у 4 пациентов с фенотипом RhCc генотип определили как CC; у 1 пациента с фенотипом Rhee — генотип *Ee* [17].

Позднее, в 2013 г., другая группа исследователей также провела сравнительный анализ генотипирования и фенотипирования антигенов

эритроцитов систем Rh и K у больных, нуждающихся в постоянных пожизненных трансфузиях [7]. У 51% обследованных пациентов были выявлены расхождения, которые могли стать причиной синтеза аллоиммунных антител. Так, у 5 пациентов с фенотипом RhCc был определён генотип CC, а у 2 пациентов с фенотипом Rhee был установлен генотип *EE*. Также у 2 человек, в фенотипе которых антиген K не был выявлен, генотип определили как *Kk*, что расширило поиск совместимых донорских гемокомпонентов. Авторы подчёркивают, что молекулярно-генетическое типирование является необходимым стандартом для трансфузионно-зависимых пациентов [7].

В то же время, молекулярно-генетические методы типирования достаточно сложны и дороги для рутинной практики, поэтому нереалистично предполагать, что донорские центры смогут обеспечить всех реципиентов совместимыми по трансфузионно важным антигенам компонентами донорской крови.

Тем не менее, расширенное типирование методами на основе ПЦР компонентов донорской крови для аллоиммунизированных реципиентов и пациентов с такими заболеваниями, как серповидноклеточная анемия и талассемия, широко применяют в рутинной практике [3, 18, 19]. Однако, несмотря на значимость молекулярно-генетических методов типирования, эти методы не заменят серологических методов. Сохранят свою актуальность и серологические методы скрининга и идентификации антиэритроцитарных аллоантител [1, 2]. Выбор методики будет зависеть от лечебного профиля и задач конкретной службы здравоохранения. Применение молекулярно-генетических методов типирования групп крови в дополнение к серологическим станет ещё одним этапом совершенствования системы обеспечения иммунологической безопасности гемотрансфузионной терапии.

ВЫВОДЫ

1. Показана возможность применения молекулярно-генетического типирования эритроцитов у доноров крови и реципиентов с трансфузионным химеризмом.

2. Расхождения результатов серологического и молекулярно-генетического типирования групп крови RhCE и Kell в образцах крови пациентов, получивших 3 и/или более трансфузий эритроцитов в течение 3 мес, зарегистрированы в 45,3% случаев.

3. Молекулярное типирование позволяет получить достоверный результат в тех случаях,

когда интерпретация результатов серологического типирования затруднена.

Участие авторов. Н.В.М. — руководитель проекта, формулировка концепции работы, написание текста; С.В.Г., Е.А.С. и Н.Н.Б. проводили исследование; И.И.К. и С.С.Б. — сбор и анализ результатов, их интерпретация, написание текста; А.В.Ч. и С.С.Б. осуществляли консультирование по клиническим вопросам, окончательное одобрение рукописи.

Источник финансирования. Исследование не имело спонсорской поддержки

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Anstee D.J. Red cell genotyping and future of pre-transfusion testing. *Blood*. 2009; 114: 248–256. DOI: 10.1182/blood-2008-11-146860.
2. Reid M.E. Transfusion in the age of molecular diagnostics. *Hematology*. 2009; 14: 171–177. DOI: 10.1182/asheducation-2009.1.171.
3. Scharberg E.A., Richter E. Red cell antigen testing. *ISBT Sci. Series*. 2015; 10: 5–11. DOI: 10.1111/voxs.12134.
4. Nambiar R.K., Narayanan G., Prakash N.P., Vijayalakshmi K. Blood group change in acute myeloid leukemia. *Proceedings (Baylor University Medical Center)*. 2017; 30: 74–75. DOI: 10.1080/08998280.2017.11929536.
5. Chapuy C.I., Nicholson R.T., Aguad M.D., Chapuy B., Laubach J.P., Richardson P.G., Doshi P., Kaufman R.M. Resolving the daratumumab interference with blood compatibility testing. *Transfusion*. 2015; 55: 1545–1554. DOI: 10.1111/trf.13069.
6. Кробинетц И.И., Минеева Н.В., Сысоева Е.А., Чечёткин А.В. Особенности интерпретации результатов исследований антигенов и антител АВ0 и Резус у пациентов с гематологическими заболеваниями. *Сибирский науч. мед. ж.* 2020; 40 (5): 66–72. [Krobinets I.I., Mineeva N.V., Sysoeva E.A., Chechetkin A.V. Features of interpretation of the results of studies of AB0 and Rhesus antigens and antibodies in patients with hematological diseases. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal*. 2020; 40 (5): 66–72. (In Russ.)] DOI: 10.15372/SSMJ20200507.
7. Bakanay S.M., Ozturk A., Ileri T., Ince E., Yavasoglu S., Akar N., Uysal Z., Arslan O. Blood group genotyping in multi-transfused patients. *Transfusion and Apheresis Sci.* 2013; 48: 257–261. DOI: 10.1016/j.transci.2013.01.009.
8. Бутина Е.В., Минеева Н.В., Зайцева Г.А., Попонина Е.А., Йовдий А.В. Аллоиммунизация к антигенам эритроцитов у пациентов с гематологическими и онкогематологическими заболеваниями. *Трансфузиология*. 2019; 21 (2): 27–34 [Butina E.V., Mineeva N.V., Zaitseva G.A., Poponina E.A., Yovdiy A.V. Red blood cell alloimmunization in patients with hematology/oncology disorders. *Transfuziologiya*. 2019; 21 (2): 27–34. (In Russ.)]
9. Wang L.Y., Liang D.C., Liu H.C., Chang F.C., Wang C.L., Chan Y.S., Lin M. Alloimmunization among patients with transfusion-dependent thalassemia in Taiwan. *Transfus. Med.* 2006; 16: 200–203. DOI: 10.1111/j.1365-3148.2006.00656.x.
10. Karimi M., Nikrooz P., Kashef S., Jamalian N., Davatolhagh Z. RBC alloimmunization in blood transfusion-dependent beta-thalassemia patients in southern Iran. *Int. J. Lab. Hematol.* 2007; 29: 321–326. DOI: 10.1111/j.1365-2257.2006.00856.x.
11. Минеева Н.В., Кробинетц И.И., Пашкова И.А., Сысоева Е.А. Аллосенсибилизация к антигенам эритроцитов. *Онкогематология*. 2015; 10 (4): 60–65. [Mineeva N.V., Pashkova I.A., Krobinets I.I., Sysoeva E.A. Allosensibilisation to erythrocyte antigens. *Onkogematologiya*. 2015; 10 (4): 60–65. (In Russ.)] DOI: 10.17650/1818-8346-2015-10-4-60-65.
12. Каландаров Р.С., Головкина Л.Л., Васильева М.Н., Стрёмухова А.Г., Пушкина Т.Д., Атрошенко Г.В., Паровичникова Е.Н. Генотипирование групп крови систем АВ0 и резус у пациентов после множественных гемотрансфузий. *Онкогематология*. 2017; 12 (2): 70–79. [Kalandarov R.S., Golovkina L.L., Vasilieva M.N., Stremouchova A.G., Pushkina T.D., Atroshchenko G.V., Parovichnikova E.N. Genotyping of AB0 and Rh systems blood groups in patients after multiple hemotransfusions. *Onkogematologiya*. 2017; 12 (2): 70–79. (In Russ.)] DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-2-70-79.
13. Belsito A., Costa D., Fioritoet C., De Iorio G., Casamassimi A., Perrotta S., Napoli C. Erythrocyte genotyping for transfusion-dependent patients at the Azienda Universitaria Policlinico of Naples. *Transfusion and Apheresis Sci.* 2015; 52: 72–77. DOI: 10.1016/j.transci.2014.12.006.
14. Castilho L., Rios M., Bianco C., Pellegrino J.Jr., Alberto F.L., Saad S.T.O., Costa F.F. DNA-based typing of blood groups for the management of multiply-transfused sickle cell disease patients. *Transfusion*. 2002; 42: 232–238. DOI: 10.1046/j.1537-2995.2002.00029.x.
15. Remeikiene D., Ugenskiene R., Inciura A., Savukaityte A., Raulinaityte D., Skrodeniene E., Simoliuniene R., Juozaityte E. Duffy and Kidd genotyping facilitates pre-transfusion testing in patients undergoing long-term transfusion therapy. *Turk. J. Haematol.* 2014; 31: 367–373. DOI: 10.4274/tjh.2013.0075.
16. Rujirojindakul P., Flegel W.A. Applying molecular immunohaematology to regularly transfused thalassaemic patients in Thailand. *Blood Transfus.* 2014; 12: 28–35.
17. Legler T.G., Eber S.W., Lakomek M., Lynen R., Maas J.H., Pekrun A., Repas-Humpe M., Schröter W., Köhler M. Application of RHD and RHCE genotyping for correct blood group determination in chronically transfused patients. *Transfusion*. 1999; 39: 852–855. DOI: 10.1046/j.1537-2995.1999.39080852.x.
18. Kulkarni S., Choudhary B., Gogri H., Patil S., Manglani M., Sharma R., Madkaikar M. Molecular genotyping of clinically important blood group antigens in patients with thalassemia. *Indian J. Med. Res.* 2018; 148: 713–720. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR_455_17.
19. Бессмельцев С.С., Романенко Н.А. *Анемия при опухолевых заболеваниях системы крови*. Руководство для врачей. М.: СИМК. 2017; 228 с. [Bessmeltsev S.S., Romanenko N.A. *Anemiya pri opukholevykh zabolevaniyakh sistemy krovi*. Rukovodstvo dlya vrachev. (Anemia in tumor diseases of the blood system. Hands for doctors.) M.: SIMK. 2017; 228 p. (In Russ.)]