

Бубеев Н.Н., bubeev@ld.ru  
СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ  
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОТИПА  
АНТИГЕНОВ ЭРИТРОЦИТОВ И  
ТРОМБОЦИТОВ.  
ЗАО «Лабораторная Диагностика»

### **Введение.**

Молекулярные методы определения антигенов эритроцитов и тромбоцитов используются уже более 20 лет. Первая система групп крови, которая была охарактеризована с помощью молекулярно-генетических методов, была система MNS (1986), затем были описаны группы ABO и Rh (1990). На октябрь 2012 года описано более 300 эритроцитарных антигенов 33 групп крови и 33 тромбоцитарных антигенов – Human Platelet Antigen (HPA), большинство из которых являются результатом точечных мутаций - Single Nucleotide Polymorphism (SNP), которые приводят к замене аминокислоты в первичной структуре антигена. Первые попытки внедрения молекулярных методов для определения групп крови были восприняты скептически, однако пример полиморфной системы антигенов лимфоцитов человека (HLA) показал, что в ближайшее время не исключено полное замещение серологических методов определения групп крови и HPA генотипированием. Активное развитие биоинформатики, разработка специализированного программного обеспечения и постоянное пополнение баз данных полиморфизмов тех или иных

локусов дает хорошие предпосылки для развития генетических технологий в трансфузиологии.

Потребность в разработке простого, надежного и производительного метода генотипирования антигенов эритроцитов и HPA постепенно росла, и в конце 1990-х годов был запущен Европейский Проект Генотипирования Крови (BloodGen Project) с участием ведущих европейских институтов и биотехнологических компаний. Целью проекта было масштабное генотипирование доноров в Европейском Союзе (ЕС) и за его пределами и создание коммерческой панели, пригодной для клинического применения.

В этом обзоре описаны технологии генетического определения групп крови и тромбоцитарных антигенов.

### **Преимущества генотипирования по сравнению с серологическими методами.**

Использование генетических методов в трансфузиологии уже сейчас позволяет упростить решение задач, которые не могут быть реализованы с помощью серологии: определение групп крови у пациентов, подверженных хроническим и множественным трансфузиям; неинвазивное определение резус-фактора плода; диагностика неонатальной тромбоцитопении (генотипирование по HPA); определение редких фенотипов групп крови в условиях отсутствия соответствующих антисывороток и многие другие. Кроме того, генетические

методы позволяют проводить виртуальный (или компьютерный) кросс-матч, что существенно сокращает временные и материальные затраты на подбор пары донор-реципиент.

### **Технологии генотипирования:**

*Секвенирование* – дорогой и самый сложный для интерпертации метод. Используется для описания новых полиморфизмов при разработке коммерческих панелей.

*Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с использованием аллель специфических праймеров (SSP)*, с последующим анализом на агарозном геле. Прародитель всех современных высокопроизводительных методов, подходит для определения малого количества образцов по нескольким антигенам.

*Мультиплексная ПЦР в реальном времени* – принципиальной особенностью является мониторинг и количественный анализ накопления продуктов ПЦР, а также автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов. Методика позволяет использовать смесь праймеров для одновременной амплификации разных фрагментов ДНК в одной пробе. Этот метод не требует стадии электрофореза.

*Гибридизация на микрочипе* – метод основан на специфическом связывании ДНК образца с иммобилизованными на микрочипе матрицами и последующим

анализе с помощью специальных сканеров. Метод позволяет определить генотип одного образца по всем известным локусам, однако, малопроизводителен. Анализ одного чипа (образца) занимает два рабочих дня.

*Технология мультиплексного анализа xMAP*. Одна из самых эффективных технологий одновременного определения множества маркеров в одном образце. Принцип метода основан на специфическом связывании ДНК образца с зондами, иммобилизованными на микросферах, окрашенных в разные цвета с последующим их анализом на проточном флуоресцентном анализаторе. Технология позволяет определять до 500 аллельных вариантов 96 образцов за 4-5 часов.

### **Заключение**

Все перечисленные выше технологии реализованы в разных коммерческих наборах и некоторые из них сертифицированы американскими и европейскими регулирующими структурами. В Российской Федерации зарегистрирована только одна тест-система, основанная на технологии ПЦР-SSP. Темпы развития современных технологий позволяют прогнозировать активное внедрение молекулярных методов в службы крови, как за рубежом, так и в нашей стране, что позволит выйти на принципиально новый уровень диагностики и предотвращения заболеваний, связанных с несовместимостью по антигенам клеток крови.