

Генотипирование групп крови систем АВО и резус у пациентов после множественных гемотрансфузий

Р.С. Каландаров, Л.Л. Головкина, М.Н. Васильева, А.Г. Стремоухова,
Т.Д. Пушкина, Г.В. Агрощенко, Е.Н. Паровичникова

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России; Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4а

Контакты: Рахман Самиевич Каландаров rkalandari@yandex.ru

Введение. У пациентов, перенесших множественные гемотрансфузии, серологическое определение групп крови систем АВО и резус становится невозможным вследствие посттрансфузионного химеризма, т. е. циркуляции в крови 2 популяций эритроцитов — собственных и донорских. Решить эту проблему помогает генотипирование групп крови.

Обзор литературы включает 42 источника литературы, в том числе 9 отечественных и 33 зарубежных.

Материалы и методы. Образцы крови 24 гематологических больных, перенесших многочисленные трансфузии эритроцитосодержащих сред. Антигены А и В, Rh D, Rh C/c, Rh E/e определяли серологическим методом с применением моноклональных антител анти-А, анти-В, анти-Д, анти-С, анти-С^w, анти-с, анти-Е и анти-е (Моabs) («Гематолог», Россия). Наличие химеризма устанавливали методом гемагглютинационного типирования в гелевых колонках ID-Cards «DiaClon ABO/D+Reverse Grouping» и «DiaClon Rh-subgroups+K». Экстракт дезоксирибонуклеиновой кислоты исследовали методом PCR-SSP с помощью коммерческих наборов с праймерами ABO-TYPE и RH-TYPE (BAG, Germany).

Результаты. У 2 пациентов с 50 % химеризмом, выявленным моноклональными антителами анти-А и анти-В, генотипически определена группа крови системы АВО. Молекулярный метод позволил идентифицировать генотип системы резус 24 больным, у которых серологическим методом выявлен процент смешанной популяции эритроцитов 20–95 по 1–5 антигенам. Определение групп крови серологическими методами через 4 мес после прекращения гемотрансфузий подтвердило все результаты генотипирования.

Заключение. Генотипирование целесообразно применять для определения групп крови пациентов, перенесших многочисленные трансфузии эритроцитосодержащих сред, что позволяет повысить иммунологическую безопасность и предотвратить аллоиммунизацию к клинически значимым групповым антигенам эритроцитов.

Ключевые слова: гемотрансфузия, посттрансфузионный химеризм, генотипирование групп крови

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-2-70-79

Genotyping of ABO and Rh systems blood groups in patients after multiple hemotransfusions

R.S. Kalandarov, L.L. Golovkina, M.N. Vasilieva, A.G. Stremouchova, T.D. Pushkina, G.V. Atroshchenko, E.N. Parovichnikova
Hematological Research Center, Ministry of Health of Russia; 4a Noviy Zykovskiy Proezd, Moscow 125167, Russia

Introduction. In patients after multiple blood transfusions, the serological determination of ABO and Rhesus blood groups becomes unreliable due to posttransfusion chimerism, i.e., circulation in the blood of two erythrocytes populations — own and donors. To solve this problem helps the genotyping of blood groups.

The literature review includes 42 literature sources, including 9 Russian and 33 foreign articles.

Materials and methods. The authors typed blood samples of 24 patients with hematological disorders after numerous erythrocyte-containing transfusions. Antigens A and B, Rh D, Rh C/c, Rh E/e were determined by the serological method using monoclonal antibodies anti-A, anti-B, anti-D, anti-C, anti-C^w, anti-c, E and anti-e (Moabs) (Hematologist, Russia). The presence of chimerism was established by hemagglutination typing in gel columns ID-Cards «DiaClon ABO / D + Reverse Grouping» and «DiaClon Rh-subgroups + K». The DNA extract was examined by PCR-SSP using commercial primers ABO-TYPE and RH-TYPE (BAG, Germany).

Results. In two patients with 50% chimerism with anti-A and anti-B monoclonal antibodies, the ABO blood group was genotypically identified. Using molecular method presence of Rhesus system antigens was established in 24 patients with 20-95% chimerism for 1-5 antigens. Serological determination of blood groups at 4 months after the cessation of blood transfusions has confirmed all genotyping results.

Conclusion. Genotyping is advisable to use to determine the blood groups in patients after numerous erythrocyte-containing transfusions, which allows increasing immunological safety and preventing alloimmunization to clinically significant erythrocytes antigens.

Key words: blood transfusion, posttransfusion chimerism, blood group genotyping

Введение

Пациенты с неэффективным гемопоэзом и анемией нуждаются в частых трансфузиях эритроцитов.

В крови пациентов, перенесших трансфузии в течение 4 предшествующих месяцев, циркулируют как минимум 2 популяции эритроцитов — собственные

и донорские. Это явление называется посттрансфузионным химеризмом. При химеризме серологическое определение групп крови становится ненадежным. Известно об иммуногенетическом типировании таких антигенов, как А, В, D, С, с, Е, е. Анализ дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) пригоден для клинического применения в различных ситуациях, особенно для идентификации групповых антигенов крови у гематологических больных, перенесших множественные гемотрансфузии.

Обзор литературы

Системы АВ0 и резус – важнейшие антигенные системы эритроцитов для практической трансфузиологии. Учет совместимости доноров и реципиентов по группе крови системы АВ0 и резус-фенотипу при гемотрансфузиях является обязательным условием предупреждения гемолитических посттрансфузионных реакций и осложнений. Современная литература, посвященная данным антигенным системам, охватывает различные аспекты, связанные с иммуногематологическим обеспечением безопасности трансфузий эритроцисодержащих компонентов крови.

Современная общая концепция иммунологической безопасности переливания эритроцитов была предложена ФГБУ «Гематологический научный центр» (ГНЦ) Минздрава России. В ней предусматривается учет совместимости донора и реципиента по 10 трансфузионно опасным антигенам эритроцитов, принадлежащим к системам АВ0, резус и Келл: А, В, D, С, с, С^w, Е, е, К, k [1]. При этом совместимость по системе АВ0 определяется, как и прежде, в соответствии с общеизвестным правилом Оттенберга. Переливать реципиентам донорские эритроциты крови следует с учетом наличия/отсутствия в них антигенов А/В, т.е. можно переливать эритроциты:

- группы крови 0(I) без антигенов А и В – пациентам с любой группой крови;
- группы А(II) с антигеном А – пациентам с группами крови А(II) и АВ(IV), т.е. реципиентам, в плазме крови которых нет естественных антител анти-А (агглютинины α по старой номенклатуре);
- группы В(III) с антигеном В – реципиентам с группами В(III) и АВ(IV), т.е. больным, в плазме крови которых нет естественных антител анти-В (агглютинины β);
- группы АВ(IV) с антигенами А и В – только пациентам с группой АВ(IV), так как у этих реципиентов в плазме нет естественных антител системы АВ0.

Таким образом, доноры с группой крови 0(I) считаются «универсальными донорами» (их эритроциты можно переливать пациентам с любой группой крови), а реципиенты с группой АВ(IV) – «универсальными реципиентами» (им можно переливать эритроциты любой группы).

В то же время при переливании плазмы крови действует противоположное правило. Переливать можно плазму крови:

- группы 0(I) с естественными антителами А и В – только больным с группой 0(I), так как только у них на эритроцитах нет антигенов системы АВ0;
- группы А(II) с антителом В – пациентам с группами крови 0(I) и А(II);
- группы В(III) с антителом А – пациентам с группами крови 0(I) и В(III);
- группы АВ(IV) без агглютининов – реципиентам любой группы.

Как отмечается в литературе, несмотря на относительную несложность процедуры определения группы крови и наличие сейчас эффективных реактивов (в том числе моноклональных реагентов, позволяющих выявлять слабые варианты антигена А), в настоящее время в клинической практике все-таки совершаются ошибки [2, 3]. Чаще всего эти они связаны с человеческим фактором при массовых исследованиях «на потоке», работе в ночное время, экстренных ситуациях в хирургии и реанимации и др. Такие условия способствуют возникновению как технических ошибок (порядок расположения реагентов, нарушение соотношения реагентов, несоблюдение необходимой продолжительности наблюдения, неправильная запись и др.), так и ошибок, связанных с возможным наличием трудноопределимых групп крови (подгруппы крови, кровяные химеры и др.). Поэтому определять группу крови должен специально подготовленный и специалист-иммуногематолог с опытом работы.

Для обеспечения совместимости донора и реципиента по резус-фенотипу в соответствии с приложением к приказу по ГНЦ № 39 от 08.05.2007 г. «О совершенствовании гемотрансфузионного обеспечения клиник института» доноров делят на 3 группы [1]:

1. Идентичные доноры и совместимые доноры – лица, не имеющие антигенов, отсутствующих у реципиента (например, для реципиента с резус-фенотипом СсDee совместимыми являются доноры с резус-фенотипами СсDee, ССDee, Ссddee, ссddee). Кровь идентичного донора может быть перелита больному без риска аллоиммунизации.
2. Донор 2-й очереди – донор, имеющий 1 минорный антиген, которого нет у реципиента (например, донор СсDEe и реципиент СсDee).
3. Донор 3-й очереди – донор, имеющий 2 минорных антигена, которых нет у реципиента (например, донор ссDEe и реципиент ССDee).

Переливание крови доноров 2-й и 3-й очереди допускается только по жизненным показаниям при условии, что у реципиента нет антител против этих антигенов.

В настоящее время продолжается совершенствование концепции иммунологической безопасности гемотрансфузий. Так, в лаборатории клиники внесено предложение о стандартизации скрининга антиэри-

троцитарных антител, что позволит освободить врача-трансфузиолога от постановки сложных проб на совместимость. Кроме того, отмечена необходимость контроля качества (удаление лейкоцитов, отсутствие снижения гемоглобина) обедненной лейкоцитами эритроцитной взвеси [4].

Продолжается изучение вопроса об аллосенсибилизации, связанной с существованием различных вариантов антигена D, и в связи с этим о людях, которые как доноры считаются резус-положительными (их кровь нельзя переливать резус-отрицательным реципиентам), а как реципиенты – резус-отрицательными (им самим можно переливать только резус-отрицательную кровь). По современным представлениям, таких людей, кроме тех, кто не имеет антигена D, но имеет антиген C или E (например, Ccdee или ccdeE), можно разделить еще на 3 группы [5].

В первую группу включают людей, на эритроцитах которых присутствуют слабые по агглютинационной способности варианты антигена D, которые обозначаются как антиген D^{weak} (или D^u) [6]. Появление слабых вариантов антигена D связано с точечными мутациями гена *RHD*. Различия между D и D^{weak} носят не качественный, а только количественный характер, т. е. на эритроцитах D^{weak} содержится меньшее количество детерминант антигена D, в связи с чем такие эритроциты слабее реагируют на анти-D антитела (низкая авидность антигена). Авидность разных вариантов D^{weak} неодинакова: наиболее сильные реагируют с моноклонами на плоскости, хотя и относительно слабо, другие проявляются в реакции солевой агглютинации, самые слабые выявляются только в непрямой пробе Кумбса. Вероятность выработки анти-D антител у реципиентов с D^{weak} невелика, но она все-таки существует [7]. Поэтому для полного исключения такой возможности этим пациентам рекомендуется переливать резус-отрицательные эритроциты. Переливание эритроцитов с D^{weak} резус-отрицательным больным противопоказано (вероятность такого переливания также незначительна, так как в подавляющем большинстве случаев на этих эритроцитах есть антиген C или E, т. е. такие доноры будут считаться положительными, даже если слабый D не будет выявлен). Таким образом, лиц с антигеном D^{weak} следует считать резус-положительными как доноров и резус-отрицательными как реципиентов. Однако дискуссии об иммунологических свойствах слабых вариантов антигена D продолжаются [8].

Во вторую группу объединены лица, имеющие на эритроцитах не все эпитопы антигена D (D^{partial}). При оценке иммуногенных свойств антигена D следует иметь в виду, что этот антиген имеет сложную структуру и состоит из разных частей – эпитопов (всего их 36), которые сами по себе могут быть самостоятельными иммуногенами. У некоторых людей антиген D может содержать не все эпитопы. Такие варианты антигена D называют парциальными D-антигенами

(D^{partial}) [9] и их синтез также обусловлен точечными мутациями гена. При гемотрансфузии донорских эритроцитов с обычным антигеном D, содержащим все эпитопы, у реципиентов с парциальным антигеном D могут вырабатываться парциальные анти-D антитела, направленные против отсутствующего у них эпитопа. Образование парциальных анти-D антител возможно также при беременности [10]. Таким образом, вероятность выработки у D-положительных лиц анти-D антител не исключена. Повторное переливание этим пациентам резус-положительных эритроцитов, содержащих все эпитопы, может привести к тяжелым посттрансфузионным осложнениям. Соответственно с парциальным D доноры тоже являются резус-положительными, а реципиенты – резус-отрицательными. В клинической практике для профилактики подобных посттрансфузионных осложнений важное значение имеет применение тройной биопробы при гемотрансфузиях.

Третья группа – это лица с антигеном D_{el}. В некоторых странах Азии (Китай, Япония) обнаружен своеобразный вариант антигена D – D_{el}. Это крайне слабый антиген, который не выявляется ни одним серологическим методом, в том числе и в непрямой пробе Кумбса, и может быть определен только при генетическом исследовании [11]. Однако в настоящее время уже доказано, что этот антиген способен вызывать синтез антител анти-D у резус-отрицательных лиц [12]. В частности, доказан факт вторичной иммунизации антигеном D_{el} резус-отрицательной пациентки, ранее уже сенсибилизированной резус-положительными эритроцитами [13]. Поэтому люди с таким антигеном также считаются резус-положительными как доноры и резус-отрицательными как реципиенты.

В клинической лабораторной диагностике факт наличия разнообразных вариантов антигена D доказывает все более возрастающую роль молекулярно-генетической диагностики, позволяющей максимально эффективно определять эти варианты [14].

Ввиду того, что при переливании эритроцитов от доноров, в крови которых присутствуют антиэритроцитарные антитела, способные вызвать гемолиз эритроцитов реципиента, несомненный интерес представляет вопрос о правилах скрининга аллоантител у доноров и о возможности привлечения к донорству сенсибилизированных лиц [15]. Отмечено, что в настоящее время в Российской Федерации исследование антиэритроцитарных антител у доноров проводится по тем же правилам, что и у реципиентов (скрининг с 3 образцами фенотипированных тест-эритроцитов в непрямом антиглобулиновом тесте), а применение компонентов крови от доноров с антителами запрещено. В то же время в других странах при исследовании крови доноров допускается использование менее чувствительных, чем при исследовании крови реципиентов, серологических методов, а также применение только 2 образцов тест-эритроцитов. Это

допустимо, поскольку при трансфузиях гемокомпонентов донорские антитела редко попадают в организм больного в большом количестве, и не все донорские антитела имеют клиническое значение. Кроме того, переливание крови от sensibilizированных доноров возможно, если у пациентов нет антигена, против которого направлены антитела донора. В этой связи для предотвращения гипердиагностики антител у доноров и исключения необоснованных отводов от донорства рекомендуется при редактировании нормативных документов о правилах проведения иммуногематологических исследований у доноров внести изменения, предусматривающие использование только анти-IgG реактивов (клиническое значение имеют только антитела класса IgG), обязательное определение специфичности антител, применение 2 образцов тест-эритроцитов и др.

Так, S. T. Nance подчеркивает, что в связи с ростом стоимости услуг здравоохранения следует выбирать методы определения антител осторожно, для того чтобы максимально повысить выявление клинически значимых антител и минимизировать клинически незначимых [16]. Для наибольшего снижения числа ошибок важна автоматизация, так как в автоматизированных методах, как правило, лучше осуществляется контроль процесса. Отбор специальных групп пациентов, которым показано определение антител в связи с несомненным риском аллоиммунизации, также будет способствовать контролю затрат в трансфузиологии. Другое направление в определении антиэритроцитарных антител – выявление этих антител у доноров. По мнению автора, выполнение такого теста позволяет устранить необходимость в «малом» тесте на совместимость (сыворотка донора против эритроцитов пациента), что делает предтрансфузионное исследование менее ресурсозатратным (меньше исследований) для больниц и дает возможность компьютерного определения совместимости для соответствующих больных.

G. Мену также ставит вопрос о значении определения клинической значимости аллоантител. Автор подчеркивает, что применяемые серологические методы не могут с абсолютной точностью предсказать, действительно ли переливание «несовместимой» по данным этих тестов крови приведет к тяжелым посттрансфузионным осложнениям, так как антитела крови реципиента, реагирующие *in vitro* с донорскими эритроцитами, могут не быть клинически значимыми *in vivo*. Не исключено, что в некоторых случаях это может привести к необоснованной задержке жизненно важной трансфузии у пациентов, которые нуждаются в постоянных переливаниях. В качестве дополнительного метода определения клинической значимости антител автор предлагает клеточную методику – исследование моноцитарного монослоя, которое может иметь особое значение, если в крови реципиента присутствуют антитела с «вариабельной»

клинической значимостью или антитела против широко распространенных антигенов, когда приходится заказывать кровь редких групп [17].

Важным показателем эффективности профилактических мероприятий по снижению риска посттрансфузионных осложнений является индекс аллоиммунизации населения (частота встречаемости аллоиммунных антител). Он неодинаков для разных регионов страны. Так, было установлено, что индекс аллоиммунизации для Кировской области в 2012 г. составил 0,64 % [18]. Среди гематологических больных частота встречаемости аллоантител в данном регионе была значительно выше – 2,4 %. По данным лечебно-профилактических учреждений г. Санкт-Петербурга, в 2013–2014 гг. индекс аллоиммунизации антиэритроцитарными антителами среди пациентов составлял 1–3,8 % [19, 20], при этом наиболее высоким процент sensibilizации был у гематологических больных, нуждающихся в многократных гемотрансфузиях. По данным тех же авторов, наиболее часто встречались антитела анти-D, что еще раз подтверждает значение антигена D как наиболее трансфузионно опасного антигена системы резус. Из моноспецифических антител были обнаружены также антитела анти-E, анти-C, анти-c. В целом эти данные, по-видимому, соответствуют наиболее современной шкале приоритета трансфузионно опасных антигенов эритроцитов: D>K>E>c>C^w>C>e [21]. Следует отметить появление антител 2 и более специфичностей – анти-D+C, анти-D+E, анти-D+C+E, а также полиспецифических антител к разным антигенным системам – анти-D+C+K, анти-D+K, анти-E+K и др. [20].

В разных странах продолжают исследования особенностей распределения групповых факторов крови среди населения с целью составления геногеографической карты соответствующих стран. Например, в иракской провинции Аль-Наджаф было установлено такое распределение групп крови системы АВ0 [22]: 0(I) – 39,7 %, А(II) – 26,5 %, В(III) – 24,4 %, АВ0(IV) – 9,4 %. Соотношение между резус-положительными и резус-отрицательными людьми – 92,6 и 7,4 % соответственно. Аналогичные исследования проводились в штате Андхра-Прадеш в Индии [23]. Полученные результаты: 0(I) – 42 %, А(II) – 13 %, В(III) – 40 %, АВ(IV) – 5 %; D-положительные лица – 99 %, D-отрицательные – 1 %.

Проводятся такие работы и в ряде регионов Российской Федерации. Так, в Республике Татарстан в 2015 г. было установлено следующее распределение групп крови среди доноров [24]: 0(I) – 33,7 %, А(II) – 31,1 %, В(III) – 23,7 %, АВ0(IV) – 11,5 %. При этом экстраагглютинины α_1 были обнаружены у 0,57 % доноров с группой А₂(II) и 12,4 % доноров с группой А₂В(IV). Резус-положительных доноров было 87,4 % (включая доноров с резус-фенотипами Ccddee, ccddEe и доноров с антигеном D^u), резус-отрицательных – 12,6 %.

Таким образом, исследования антигенов и антител важнейших антигенных систем эритроцитов продолжают по различным направлениям, что будет способствовать повышению эффективности профилактики посттрансфузионных реакций и осложнений. Прежде всего необходимо отметить, что в настоящее время на качественно новый уровень поднимается решение проблемы тестирования групп крови различных антигенных систем эритроцитов у доноров и реципиентов. Наряду с сохраняющими значение классическими иммуногематологическими методами осуществляется все более широкое внедрение молекулярных методов определения групповых факторов крови – методов полимеразной цепной реакции (ПЦР), т.е. скрининга молекул ДНК на наличие генов, кодирующих те или иные групповые антигены эритроцитов.

В наиболее ранних публикациях, посвященных молекулярным методам определения групп крови, рассматривались вопросы развития и применения этих методов. W.A. Flegel и соавт. [25] в 1998 г. отмечали, что с начала применения в 1993 г. типирования антигенов системы резус по ДНК этот метод внедрен в практику пренатального типирования, в том числе для скрининга и первичной характеристики парциального D. Авторы рекомендовали включение в генетическое типирование исследования различных полиморфизмов и отмечали важность поиска подходов к постепенному повышению надежности и экономической эффективности типирования групп крови молекулярными методами. При этом авторы считали возможным, что при определенных условиях генетическое типирование может заменить превалирующие ныне серологические методы даже во многих рутинных исследованиях. Подчеркивалось, что трансфузионная медицина имеет уникальную возможность использовать максимально широкую базу данных фенотипов для проверки и развития молекулярных методик.

Уже значительно позже, в 2006 г., в литературном обзоре W.A. Flegel [26] отмечал, что за последние 5 лет произошел переход от создания базовой молекулярно-генетической техники к внедрению молекулярно-генетических исследований в клиническую практику. К тому времени было обнаружено более 150 аллелей одного только гена *RHD*. Кодированные данными аллелями антигены классифицированы по антигенным и клиническим особенностям как определенные фенотипы – парциальный D, слабый D и DEL. Эти разнообразные аллели широко варьируют среди человеческих популяций, что представляет ценность для трансфузиологии. Автор подчеркнул, что генетическая диагностика групповых антигенов эритроцитов обеспечит экономически выгодное развитие трансфузионной медицины.

Важное значение в работах по генотипированию антигенных систем эритроцитов имеет изучение

возможности его применения для точного определения групповых факторов крови у пациентов, перенесших множественные гемотрансфузии, и установление в таких случаях преимущества данного метода перед серологическими методиками.

R.E. Wenk, F.A. Chiafari [27] в 1999 г. сообщили о предварительных работах, посвященных проверке возможности типирования ДНК у реципиентов после массивной гемотрансфузии. У ограниченного числа взрослых реципиентов, перенесших массивные трансфузии с содержащими лейкоциты компонентами крови, были проведены претрансфузионные и посттрансфузионные типирования ДНК методами Саузерн-блоттинга и ПЦР. Во всех исследованиях соответствующие данные оказались идентичными. Это позволило предположить, что некоторые ДНК-методы могут обеспечить надежное типирование у взрослых реципиентов после массивной трансфузии.

В 2000 г. T.G. Legler и соавт. [28] провели сравнительный анализ генотипирования резус-принадлежности и данных серологического определения резус-фенотипа в группе больных, нуждающихся в постоянных пожизненных трансфузиях. В 2 случаях D-отрицательные по серологическим тестам пациенты генотипически оказались D-положительными; 4 пациента, серологически имевшие фенотип Cc, генотипически были гомозиготными по C (C/C); 1 реципиент серологически имел фенотип ee, а генотипически – E/e. Авторы отметили, что у больных с постоянными трансфузиями серологическое определение групп крови может быть невозможно или ненадежно из-за ложноположительной агглютинации. Таким образом, генетическое исследование обеспечило правильный результат.

В том же году P. Rozman и соавт. [29] провели анализ образцов крови до и после переливания у пациентов, недавно перенесших многочисленные гемотрансфузии. Применялось генотипирование ДНК методом ПЦР с использованием содержащих специфическую последовательность праймеров, которое позволяло одновременно и быстро определять группы систем ABO, резус, Келл, Кидд и Даффи. Серологическими методами в крови пациентов были обнаружены смешанные популяции эритроцитов с разными группами крови (химеризм). Генотипирование периферической крови позволило во всех случаях получить результаты, идентичные аутологичному фенотипу групп крови, независимо от объема перелитой крови и времени после трансфузии. Таким образом, было показано, что ПЦР позволяет быстро и надежно определять аутологичные группы крови систем ABO, резус, Келл, Кидд и Даффи, даже если больной недавно перенес множественные трансфузии.

M.E. Reid и соавт. [30] также изучали возможность применения ПЦР с использованием ДНК, полученной из лейкоцитов пациентов, недавно перенесших гемотрансфузии, для установления группового антигенного профиля данных пациентов. Чтобы устранить

проблемы, возникающие в связи с низким качеством ДНК, использовали праймеры, фиксирующиеся на флангах интересующего участка ДНК и реплицирующие соответствующий короткий ПЦР-ампликон. Было установлено, что во всех случаях молекулярный анализ соответствовал результатам фенотипирования. Таким образом, авторы тоже доказали, что ПЦР обеспечивает надежное определение аллелей, кодирующих групповые факторы крови.

Н. Kroll и соавт. организовали массовую исследовательскую работу по генотипированию самых значимых антигенов тромбоцитов, гранулоцитов и эритроцитов [31], в которой участвовали 33 института из Германии, Австрии и Швейцарии. Что касается исследований эритроцитов, то 12 лабораторий типировали наиболее распространенные антигены систем АВ0 и резус и еще 4 лаборатории ограничились типированием гена *RHD*. Применяли в основном метод ПЦР с содержащими специфическую последовательность праймерами, а также анализ фрагментов ограниченной длины, олигонуклеотид-лигазную пробу и др. При этом ошибки в определении группы крови системы АВ0 были допущены в 5,2 % случаев, резус-фенотипа – в 0,3 % случаев. Работа продемонстрировала существование различных надежных техник генотипирования аллоантигенов клеток крови и высокие стандарты деятельности участвующих лабораторий. Однако частота ошибок при определении группы крови системы АВ0 в 5,2 % показала, что необходимы дальнейшие усилия, чтобы повысить точность генотипических методик. По заключению авторов, будущие исследования должны будут подобрать методы и участников с редкими вариантами генов, кодирующих антигены эритроцитов, чтобы гарантировать надежность генотипирования, в том числе в пренатальной диагностике несовместимости матери и плода.

D.J. Anstee [32], подчеркивая ценность методов генотипирования групп крови, основанных на анализе ДНК, в то же время отмечает, что в перспективе молекулярная диагностика не сможет полностью заменить рутинные серологические методы определения групповых факторов. Сохранят свое значение также серологические методы выявления и идентификации клинически значимых антиэритроцитарных антител. Теоретически возможно определение генотипов донора и реципиента электронным методом с применением генчиповой технологии. Однако эти методы достаточно сложны, и, кроме того, нереалистично полагать, что донорская кровь, имеющаяся в наличии в какой-либо определенный момент времени, может быть протипирована для всех пациентов по всем трансфузионно опасным антигенам. Тем не менее, подчеркивает автор, расширенное (не только по АВ0 и резус) генотипирование компонентов крови для реципиентов с предсуществующими антителами и с несомненной предрасположенностью к аллоиммунизации уже

широко применяется как рутинное исследование. Совместное использование основанной на ДНК-анализе методологии и серологических методов улучшит обеспечение широко фенотипированной донорской кровью пациентов, в том числе с аллоантителами.

М.Е. Reid [33] также отмечает, что классические гемагглютинационные методы определения групповых антигенов эритроцитов имеют определенные ограничения, часть из которых может быть устранена тестированием ДНК. При этом данные тесты позволяют сохранить антитела для подтверждения установленной антиген-негативности. Доказана эффективность генотипирования для определения важных антигенов различных систем. Но типирование ДНК не может сравниться по простоте с серологическими методами. Поэтому, по мнению автора, генотипирование не показано для рутинного скрининга, но небольшим контингентам больных с антителами к определенным антигенам оно может обеспечить дополнительную безопасность и эффективность гемотрансфузий. Имеет несомненную ценность типирование так называемых «минорных» антигенов в относительно небольших группах пациентов, у которых в плазме присутствуют аллоантитела к определенным комбинациям таких антигенов или у которых потенциально возможен иммунный ответ.

В 2015 г. Е.А. Scharberg и соавт. [34] в отношении серологических методов тестирования антигенов эритроцитов отмечали, что отсутствуют сертифицированные коммерческие реактивы для определения некоторых антигенов. Поскольку возможны ложноотрицательные реакции со слабыми или парциальными вариантами антигенов, типирование крови доноров требует более чувствительных методик и реагентов. В последние 10 лет молекулярное ДНК-типирование аллелей групп крови становится применимым для рутинного скрининга. Устанавливая генотипы, это исследование дает необходимую информацию, чтобы предугадать фенотип по антигенам эритроцитов, когда серологическое тестирование невозможно вследствие ограниченности в наличии реагентов или у пациентов, перенесших трансфузии.

В настоящее время вопрос о роли генотипирования групп крови у пациентов, постоянно нуждающихся в гемотрансфузиях, сохраняет актуальность. S.M. Vakanay и соавт. [35] с учетом того, что результаты серологических исследований групповых факторов разных антигенных систем эритроцитов могут оказаться ошибочными из-за предшествующих многократных трансфузий вследствие появления кровяных химер, провели сравнительный анализ данных фенотипирования и генотипирования групп крови у ряда больных с заболеваниями, требующими постоянных трансфузий (талассемия и др.). У 51 % обследованных были обнаружены расхождения между результатами фено- и генотипирования, причем в большинстве случаев эти расхождения потенциально могли привести к аллоиммунизации пациентов. Так, 5 человек,

у которых был определен фенотип Сс, оказались на самом деле гомозиготными по С, 2 пациента, фенотипированные как гомозиготные по антигену е, оказались гомозиготными по антигену Е. Кроме того, у 2 человек, фенотипически Келл-отрицательных, генотипически была установлена гетерозиготность по антигену К, что повысило шансы на нахождение необходимых доноров эритроцитов. Авторы делают вывод, что генотипирование групп крови жизненно важно для нуждающихся в постоянных трансфузиях пациентов, особенно если реципиенты не были фенотипированы перед началом первичной гемотрансфузии.

В некоторых работах рассматриваются и другие аспекты обеспечения безопасности гемотрансфузий с помощью генотипирования групповых антигенов эритроцитов. S.T. Chou и соавт. [36] изучали эффективность проверки на совместимость донорской крови по антигенам систем резус и Келл у больных с серповидно-клеточной анемией при переливании им крови от доноров-афроамериканцев. Было установлено, что у значительного числа пациентов выработались антитела против антигенов, по которым их эритроциты были фенотипически положительными. Этот феномен позволил объяснить высокочувствительное генотипирование по системе резус, которое выявило в таких случаях различные варианты аллелей, т. е. аллоиммунизация была обусловлена существованием парциальных антигенов системы резус. Авторы считают необходимым изучить возможность снижения риска аллоиммунизации путем генотипирования пациентов и некоторой (небольшой) части доноров.

Типирование групп крови по ДНК применяется и в акушерской практике. A. Goosch и соавт. [37] представили новую инструкцию по определению групп крови и тестированию антител при беременности. В инструкции, в частности, определяются показания для генотипирования плода. Такими показаниями являются: высокая концентрация клинически значимых антител в крови матери, наличие в анамнезе гемолитической болезни новорожденных и гетерозиготность отца по важным антигенам. Отмечается, что до недавнего времени для получения ДНК плода, необходимой для ПЦР, применяли инвазивные методы — амниоцентез или пробу на хориональные ворсины. Но эти процедуры несут некоторый, хотя и небольшой, риск спонтанного выкидыша и могут повысить активность материнских антител. В настоящее время создана новая техника точного определения D-генотипа плода, основанная на получении ДНК плода, циркулирующей в материнской периферической плазме. Предполагается, что в дальнейшем важное значение будет иметь внедрение массового типирования ДНК плода из материнской крови, и это широкомасштабное исследование станет возможным в недалеком будущем. Разрабатываются также методики генотипирования плода по антигенам с и К.

Еще один аспект генетического исследования групп крови — вопрос экономической эффективности этих методов и, как следствие, необходимость их применения во всех случаях гемотрансфузий. M.S. Karafin и соавт. [38] отмечают, что совершенствование и расширенное использование молекулярного генотипирования донорских эритроцитов повышают эффективность обеспечения антигенной совместимости при трансфузиях. С каждым годом методы молекулярного типирования обходятся для пациентов все дешевле и уже способны выявлять за одно исследование больше антигенов эритроцитов, чем существующие стандартные серологические методы. Возражая на это, S. Kasker и соавт. [39] утверждают, что, хотя молекулярное генотипирование действительно становится все более дешевым и широко применяемым, но при существующей ограниченности ресурсов даже эффективные и широко распространенные тестовые методы вряд ли смогут решить базовую проблему нехватки совместимой крови, поэтому анализ ДНК не обязательно применять во всех случаях, чтобы не удорожать исследование. Вероятно, пока этот вопрос остается дискуссионным.

С предыдущими темами связана проблема рационального использования имеющейся донорской крови. J. Curvers и соавт. [40] описывают случай генотипирования группы крови и резус-фактора (D) у пациентки с множественными травмами. Ввиду экстренной ситуации первоначально переливание крови было проведено на месте дорожно-транспортного происшествия без определения группы крови пострадавшей, поэтому ей было перелито несколько доз эритроцитов 0(I)D—. После массивной гемотрансфузии определить группы крови пациентки серологическими методами оказалось невозможно. Тогда ей было выполнено генотипирование в ПЦР, благодаря чему было установлено, что у потерпевшей кровь A(II)D— (гетерозиготность — 0IAI). Поэтому в дальнейшем пациентке переливали донорские эритроциты A(II)D—. Таким образом, данный случай демонстрирует, как генотипирование групп крови позволяет уменьшить применение в острой ситуации донорской крови 0(I)D—, когда это не является необходимым.

Продолжается совершенствование методов генотипирования групп крови различных антигенных систем эритроцитов. E.S. Rodrigues и соавт. [41] предложили для быстрого и надежного генотипирования групп крови систем резус, MNS, Кидд и Даффи у пациентов с многократными гемотрансфузиями оптимизированную распознающую аллели в реальном времени ПЦР. Применение серологических методов определения групповых факторов крови имеет ограничения, например, у недавно перенесших трансфузии больных (химеризм) и у больных с положительным прямым антиглобулиновым тестом. Результаты ПЦР не зависят ни от циркулирующих эритроцитов донора, ни от аутоиммунных антител. Изученный

авторами метод ПЦР позволяет определять разные аллели генотипов, кодирующих антигенные системы. По сравнению с конвенциональной ПЦР данный метод более чувствителен, т.е. позволяет работать с меньшими количествами ДНК. Эта разновидность ПЦР обеспечивает лучшую воспроизводимость результатов, быструю (через несколько часов после экстракции ДНК) и точную молекулярную диагностику и значительное удешевление исследований (в том числе за счет использования меньшего количества реагентов). ПЦР в реальном времени имеет большой потенциал для автоматизации методов генотипирования групп крови эритроцитарных систем.

Итак, приведенные данные публикаций охватывают различные аспекты генетического определения групп крови эритроцитарных систем у доноров и реципиентов и отражают растущую роль молекулярной диагностики в практической трансфузиологии.

Цель работы – проверить возможность идентификации групп крови у гематологических пациентов после многочисленных гемотрансфузий.

Материалы и методы

Образцы крови, взятые на коагулянтах – цитрате или ЭДТА, были серологически типированы на антигены А и В, Rh D, Rh C/c, Rh E/e с применением моноклональных антител анти-А, анти-В, анти-D, анти-С, анти-С^w, анти-с, анти-Е и анти-е (Моabs) («Гематолог», Россия). Геагглютинационное типирование в гелевых колонках ID–Cards (DiaClon ABO/D+Reverse Grouping и DiaClon Rh-subgroups+K) было использовано для подтверждения химеризма у больных после переливания: агглютинированные клетки формировали красную линию на поверхности геля, а неагглютинированные образовывали «пуговку» на дне микротубы. Экстракт ДНК исследовали

Таблица 1. Генотипирование групп крови ABO у больных с химеризмом
Table 1. Genotyping of ABO blood groups in patients with chimerism

Химеризм, % Chimerism, %		Генотипирование Genotyping
с анти-А with anti-A	с анти-В with anti-B	
50	50	B1B1 (нет α) B1B1 (no α)
50	100	A1B1

с помощью коммерческих наборов PCR-SSP с праймерами для типирования ABO, RHD и RHCE (BAG, Germany).

Результаты

В 2015 г. авторы серологически типировали образцы крови 2055 гематологических пациентов, русских по происхождению. Проблемы с определением групп крови по системе ABO, связанные с посттрансфузионным химеризмом, были обнаружены у 32 первичных больных (1,6 %), по системе резус – у 64 первичных больных (3,2 %). От 24 пациентов было получено информированное согласие на генотипирование. Все пациенты страдали от идиопатической или симптоматической цитопении либо изолированной анемии (апластическая анемия – 5, различные формы острых лейкозов – 3, миелодиспластический синдром – 4, множественная миелома – 2, β-талассемия – 1, постгерпетическая невралгия – 1, анемия неясного генеза – 6, парциальная красноклеточная аплазия – 1, с трансплантированной почкой – 1) и перенесли трансфузии перед госпитализацией в ГНЦ. Проблемы с определением группы крови ABO были у 2 пациентов: у 1 был выявлен 50 % химеризм с моноклонами анти-А

Табл. 2. Химеризм и результаты генотипирования

Table 2. Chimerism and genotyping results

Число больных, n Number of patients, n	Химеризм по антигенам системы резус, % Chimerism in the Rh system antigens, %						Генотипирование Genotyping	
	a-D	a-C	a-c	a-Cw	a-E	a-e	Результат Results	Число угаданных результатов + химеризм, абс. (%) Number of guessed results + chimerism, total (%)
17		40–90					RHCExC	5 (20–95)
13			50–90				RHCExc	9 (40–90)
3				5–50			RHCExCw	2 (5)
4	20–90						RHD	3 (20–90)
18					30–90		RHCExE	9 (30–90)
7						50–95	RHCExe	3 (95)

и анти-В, у другого было 50 % неагглютинированных эритроцитов с анти-А. При генотипировании у этих больных установлены соответственно В1В1 и А1В1 (табл. 1). У 24 гематологических больных не удалось определить резус-фенотип: RhC – у 17 (присутствие агглютинированных эритроцитов – 40–90 %), Rhc – у 13 (50–90 %), RhD – у 4 (20–90 %), RhE – у 18 (30–90 %), Rhe – у 7 (50–95 %), RhC^w – у 3 (5–50 %) (табл. 2). Таким образом, посттрансфузионный химеризм по 1 антигену системы резус был обнаружен у 5 гематологических больных, по 2 – у 7 больных, по 3, 4 и 5 антигенам – соответственно у 6, 5 и 1 больного (табл. 3). Наличие антигена RhC^w было подтверждено у 2 пациентов с 50 % химеризмом по RhC^w путем генотипирования. Молекулярным методом было установлено присутствие антигена RhC у 5 гематологических пациентов с химеризмом (от 20 до 95 %), наличие антигена Rhc – у 9 больных (40 % до 90 %), RhD – у 3 (20 % до 90 %), RhE – у 9 (от 30 до 90 %) и Rhe – у 3 пациентов с химеризмом 95 %. Мониторинг групп крови у всех гематологических больных через 4 мес после прекращения эритроцитсодержащих трансфузий подтвердил фенотипы, предсказанные генотипированием.

Заключение

Определение группы крови АВ0 и резус-фенотипа очень важно для ранее перенесших трансфузии

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Таблица 3. Количество антигенов системы резус, по которому у обследованных больных (N = 24) обнаружен посттрансфузионный химеризм

Table 3. The number of Rhesus system antigens on which in patients (N = 24) posttransfusion chimerism is detected

Количество антигенов системы резус The number of Rh system antigens	Число больных с посттрансфузионным химеризмом, n Number of patients with posttransfusion chimerism, n
1	5
2	7
3	6
4	5
5	1

пациентов и для пациентов с выявленными иррегулярными антителами. Генотипирование групп крови нашло применение в трансфузиологической медицине и позволяет предотвратить аллоиммунизацию к наиболее клинически значимым групповым антигенам эритроцитов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Донсков С.И., Гапонова Т.В. Иммунологическая безопасность переливания эритроцитов (развитие концепции). Вестник службы крови России 2013;2:1–9 [Donskov S.I., Gaponova T.V. Immunological safety of red blood cell transfusions (concept development). Vestnik sluzhby krovi Rossii = Bulletin of Russia Blood Service 2013;2:1–9 (In Russ.)].
- Chiaroni J., Legrand D., Dettori I. et al. Analysis of ABO discrepancies occurring in 35 French hospitals. Transfusion 2004;44:860–3. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2004.03337.x.
- Migeot V., Ingrand I., Salmi R.L. et al. Reliability of bedside ABO testing before transfusion. Transfusion 2002;42:1348–55. PMID: 12423520.
- Жибурт Е.Б., Шестаков Е.А., Караваев А.В. и др. Стратегия безопасности переливания крови. Гематология и трансфузиология 2012;57(3):10. [Zhiburt E.B., Shestakov E.A., Karavaev A.V. et al. Strategy of blood transfusion safety. Gematologiya i transfuziologiya = Hematology and Transfusiology 2012;57(3):10 (In Russ.)].
- Shautskova L.Z., Shogenov Z.S. The Rhesus blood group system: analytical review. Modern problems of science and education 2015; Issues 2 (Part 1).
- Westhoff C.M. The Structure and Function of the Rh Antigen Complex. Seminars in Hematology 2007;44(1):42–50. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2006.09.010.
- Flegel W.A. How I manage donors and patients with a weak D phenotype. Current Opinion in Hematology 2006;13(6):476–83. DOI: 10.1097/01.moh.0000245694.70135.c3.
- Garratty G. Do we need to be more concerned about weak D antigens? Transfusion 2005;45(Issue 10): 1547–1551. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2005.00625.x.
- Avent N.D., Finning K.M., Liu W. et al. Molecular biology of partial D phenotypes. Transfus Clin Biol 1996; 3(Issue 6):511–6. PMID: 9018818.
- Wagner F.F., Eicher N.I., Jorgensen J.R. et al. DNB: a partial D with anti-D frequent in Central Europe. Blood 2002;100:2253–6. DOI: 10.1182/blood-2002-03-0742.
- Silvy M., Simon S., Gouvisos J. et al. Weak D and DEL alleles detected by routine SNaPshot genotyping: identification of four novel RHD alleles. Transfusion 2011;51(2):401–11. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2010.02830.x.
- Wagner T., Kormoczi G., Buchta C. et al. Anti-D immunization by DEL red blood cells. Transfusion 2005;45: 520–6. DOI: 10.1111/j.0041-1132.2005.04256.x.
- Yasuda H., Ohto H., Sakuma S. et al. Secondary anti-D immunization by DEL red blood cells. Transfusion

- 2005;45(10):1581–4.
DOI: 10.1111/j.1537-2995.2005.00579.x.
14. Wagner F.F., Gasner C., Müller T.H. et al. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood* 1999;93:385–93. PMID: 9864185.
 15. Минеева Н.В. Особенности исследования антител к антигенам эритроцитов у доноров. *Трансфузиология* 2013;13(3):14–20. [Mineeva N.V. Features of antibodies to erythrocyte antigens detection in donors. *Transfuziologiya = Transfusiology* 2013;13(3):14–20 (In Russ.)].
 16. Nance S.T. Red cell antibody detection by serology. *ISBT Science Series* 2015;10(Suppl. 1):1–4. DOI: 10.1111/voxs.12128.
 17. Meny G. Determining the clinical significance of alloantibodies. *ISBT Science Series* 2015;10(Suppl. 1):39–43. DOI: 10.1111/voxs.12124.
 18. Бутина Е.В., Зайцева Г.А., Удальцова В.Ф. и др. Аллосенсибилизация к антигенам эритроцитов у доноров компонентов крови и пациентов с заболеваниями системы крови. *Вестник службы крови* 2012;3:18–21. [Butina E.V., Zaytseva G.A., Udaltsova V.F. et al. Allosensitization to erythrocyte antigens in blood donors and patients with blood diseases. *Vestnik sluzhby krovi Rossii = Bulletin of Russia Blood Service* 2012;3:18–21 (In Russ.)].
 19. Минеева Н.В., Гавровская С.В., Кроби-нец И.И. и др. Частота выявления антиэритроцитарных, антилейкоцитарных, антитромбоцитарных аллоантител у больных гематологическими заболеваниями. *Онкогематология* 2013;4:13–7. [Mineeva N.V., Gavrovskaya S.V., Krobintets I.I. et al. Frequency of anti-erythrocyte, antileukocytic, antiplatelet alloantibodies in patients with hematological diseases. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2013;4:13–7 (In Russ.)].
 20. Минеева Н.В., Пашкова И.А. Специфичность антиэритроцитарных антител у больных многопрофильного стационара. *Трансфузиология* 2014;15(1):53–4. [Mineeva N.V., Pashkova I.A. Specificity of anti-erythrocyte antibodies in patients in multidisciplinary hospital. *Transfuziologiya = Transfusiology* 2014;15(1):53–4 (In Russ.)].
 21. Донсков С.И., Морокков В.А. Группы крови человека: Руководство по иммуносерологии. М., 2011. 1016 с. [Donskov S.I., Morokov V.A. Human blood groups. Guide to immunoserology. Moscow, 2011. 1016 pp. (In Russ.)].
 22. Salah K.H., Alaa H.A. Normal distribution of ABO blood groups and Rhesus factor in Al-Najaf province. *European Journal of Experimental Biology* 2015;5(7):18–21.
 23. Prakash D.S., Varma P.J., Reddy S.G. et al. Genetic Variation of Blood Group Polymorphism among an Endogamous Human Population from Andhra Pradesh, India. *International Journal of Scientific Study* 2013;1(2):22–5. Available at: http://www.ijss-sn.com/uploads/2/0/1/5/20153321/original_article_3.pdf.
 24. Белоухов В.М., Тураев Р.Г., Бельская Е.Е. и др. Распределение групп крови среди доноров Республики Татарстан. *Казанский медицинский журнал* 2015;96(3):437–40. [Belopukhov V.M., Turaev R.G., Belskaya E.E. et al. Distribution of Blood Groups among the Donors of the Republic of Tatarstan. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal* 2015;96(3):437–40 (In Russ.)]. DOI: 10.17750/KMJ2015-437.
 25. Flegel W.A., Wagner F.F., Muller T.H. et al. Rh phenotype prediction by DNA typing and its application to practice. *Transfusion Medicine* 1998;8:281–302. PMID: 9881423.
 26. Flegel W.A. Molecular genetics of RH and its clinical application. *Transfus Clin Biol* 2006;13:4–12. DOI: 10.1016/j.tracli.2006.02.011.
 27. Wenk R.E., Chifari F.A. DNA typing of recipient blood after massive transfusion. *Transfusion* 1997;37:1108–10. PMID: 9426631.
 28. Legler T.G., Eber S.W., Lakomek M. et al. Application of RHD and RHCE genotyping for correct blood group determination in chronically transfused patients. *Transfusion* 1999;39:852–5. PMID: 10504121.
 29. Rozman P., Dovc T., Gassner C. Differentiation of autologous ABO, RHD, RHCE, KEL, Jk and FY blood group genotypes by analysis of peripheral blood samples of patients who have recently received multiple transfusions. *Transfusion* 2000;40:936–42. PMID: 10960520.
 30. Reid M.E., Rios M., Powell V.I. et al. DNA from blood samples can be used to genotype patients who have recently received a transfusion. *Transfusion* 2000;40:48–53. PMID: 10644811.
 31. Kroll H., Carl B., Santoso S. et al. Workshop Report on the Genotyping of Blood Cell Alloantigens. *Transfusion Medicine* 2001;11:211–9. PMID: 11422952.
 32. Anstee D.J. Red cell genotyping and future of pretransfusion testing. *Blood* 2009;114(2):248–56. DOI: 10.1182/blood-2008-11-146860.
 33. Reid M.E. Transfusion in the age of molecular diagnostics. *Hematology* 2009;1:171–7. DOI: 10.1182/asheducation-2009.1.171.
 34. Scharberg E.A., Richter E., Bugert P. Red cell antigen testing. *ISBT Science Series* 2015;10(1):5–11. DOI: 10.1111/voxs.12134.
 35. Bakanay S.M., Ozturk A., Ileri T. et al. Blood group genotyping in multi-transfused patients. *Transfusion and Apheresis Science* 2013;48:257–61. DOI: 10.1016/j.transci.2013.01.009.
 36. Chou S.T., Jackson T., Vege S. et al. High prevalence of red cell alloimmunization in sickle cell disease despite transfusion from Rh-matched minority donors. *Blood* 2013;122(6):1062–71. DOI: 10.1182/blood-2013-03-490623.
 37. Gooch A., Parker J., Wray J. et al. Guideline for blood grouping and antibody testing in pregnancy. *Transfusion Medicine* 2007;17:252–62. DOI: 10.1111/j.1365-3148.2007.00767.x.
 38. Karafin M.S., Denomme G.A., Bryant B.J. The future of red blood cell alloimmunization risk reduction. *Transfusion* 2015;55:220–1. DOI: 10.1111/trf.12863.
 39. Kacker S., Ness P.M., Sue Shirey R. The future of red blood cell alloimmunization risk reduction. *Transfusion* 2015;55:222–3. DOI: 10.1111/trf.12866.
 40. Curvers J., Scharnhorst V., de Haas M. et al. Blood group genotyping in a multitrauma patient: a case report. *Immunoematology* 2012;28(3):85–7. PMID: 23286553.
 41. Rodrigues E.S. et al. Rapid blood group genotyping by allelic discriminative real-time PCR in multiply transfused patients. *Transfusion Medicine* 2015;1–4. DOI: 10.1111/tme.12186.