ISSN 0039-4521

Минздравсоцразвития России

ФГУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Минздравсоцразвития России

66wTXk537Fbz4

СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКАЯ ЭКСПЕРТИЗА

Том 54 **июль—август** **4.2011**

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Научно-практический журнал **«Судебно-медицинская экспертиза»** цитируется и индексируется в следующих электронных поисковых системах/базах данных: РИНЦ (Российский индекс научного цитирования), Google Scholar, «Index Medicus». Основан в 1958 г.
Выходит 6 раз в год.

Journal «Forensic medical examenation» is publised 6 times a year by Media Sphera Published Group. Founded in 1958.

Издательство МЕДИА СФЕРА:
127238 Москва,
Дмитровское ш., 46, корп. 2, этаж 4
Тел.: (495) 482-4329
Факс: (495) 482-4312
Отдел рекламы:
Тел.: (495) 482-0604
Отдел подписки:
Тел.: (495) 482-5336
Факс: (495) 482-4312
E-mail: mediasph@mediasphera.ru
www.mediasphera.ru
Адрес для корреспонденции:
127238 Москва, а/я 54, Медиа Сфера

АДРЕС РЕДАКЦИИ:
125284 Москва, ул. Поликарпова, 12/13, РЦСМЭ
Зав. редакцией **А.В. Николаева**
Тел.: (495) 946-1362
E-mail: journal@rc-sme.ru
E-mail: rcsme@sudmed.ru
Свидетельство о регистрации:
ПИ № ФС 77-29217 от 24.08.07
Редактор Л.И. Федяева

Оригинал-макет изготовлен
Издательством МЕДИА СФЕРА
Компьютерный набор и верстка:
М.Л. Калужнин, С.В. Олефир
Корректоры: В.Ю. Глазунова,
И.В. Корягина, Е.А. Папоян

Индекс 71470
для индивидуальных подписчиков
Индекс 71471
для предприятий и организаций

Формат 60×90 1/8; тираж 1500 экз.
Усл.печ.л. 8,5
Заказ 102
Отпечатано в "Информполиграф"

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

И.о. главного редактора В.В. Жаров

И.В. Буромский
В.В. Жаров (зам. главного редактора)
В.Н. Звягин
П.Л. Иванов
В.Н. Крюков
А.В. Ковалев (ответственный секретарь)
М.И. Лапенков
Б.М. Лисянский (ответственный секретарь)
Ю.И. Пиголкин
П.В. Пинчук
В.Л. Попов
П.О. Ромодановский
Е.М. Саломатин
И.А. Толмачев
М.В. Федулова
В.А. Фетисов
П.П. Ширинский
О.Д. Ягмуров

Решением Высшей аттестационной комиссии (ВАК) Министерства образования и науки РФ журнал «Судебно-медицинская экспертиза» включен в Перечень рецензируемых научных журналов и изданий, выпускаемых в Российской Федерации, в которых рекомендована публикация основных результатов диссертационных исследований на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук.

Издательство **МЕДИА СФЕРА** Москва · **MEDIA SPHERA** Publishing GROUP Moscow

Определение RhD-антигена системы резус методом полимеразной цепной реакции в реальном времени

Д.м.н. М.И. ЛАПЕНКОВ[1], сотр. Н.В. ПЛАХИНА[1], ст.н.с. Т.Л. НИКОЛАЕВА[2], науч. дир. Я.И. АЛЕКСЕЕВ[3], в.н.с. Д.А. ВАРЛАМОВ[3]

The detection of RhD antigen of the rhesus system by the real time polymerase chain reaction

M.I. LAPENKOV, N.V. PLAKHINA, T.L. NIKOLAEVA, YA.I. ALEKSEEV, D.A. VARLAMOV

[1]Институт криминалистики (нач. — В.М. Богданов) Центра специальной техники ФСБ России, [2]ФГБУ ГНЦ (дир. — акад. РАМН А.И. Воробьев) Минздравсоцразвития России, [3]ЗАО «Синтол» (дир. — А.В. Кузубов), Москва

Описана методика определения резус-принадлежности по препарату ДНК методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием разработанной авторами тест-системы. Проведенные испытания на широком спектре образцов показали возможность применения тест-системы в медицине и криминалистике.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция в реальном времени, резус-принадлежность, криминалистические образцы.

A method for the detection of RhD using a DNA preparation and the newly-developed test-system based on the real time polymerase chain reaction is described. The study including a large variety of specimens has demonstrated the applicability of the novel system to forensic medical examination.

Key words: real time polymerase chain reaction, rhesus system, forensic specimens.

В трансфузионной медицине система резус является второй по клинической значимости (после АВ0) среди эритроцитарных систем групповой принадлежности крови человека. Среди более 100 Rh-антигенов наиболее иммуногенным и потому имеющим наибольшее практическое значение является RhD-антиген, с которым связано большинство осложнений, обусловленных резус-несовместимостью.

Резус-принадлежность крови до последнего времени определяли серологическими методами. Однако в ряде случаев (например, у лиц, перенесших множественные переливания крови, у аутоиммунных больных) выявление антигенов бывает затруднено. В отличие от серологического исследования, при котором объектом исследования являются эритроциты, генетический анализ дает более достоверный ответ, поскольку прямо указывает на наличие гена, ответственного за проявление исследуемого антигена.

В акушерстве с RhD-антигеном связана проблема сенсибилизации резус-отрицательных женщин резус-положительными эритроцитами плода, что приводит в дальнейшем к тяжелой патологии — гемолитической болезни новорожденных. Молекулярно-генетическое определение резус-принадлежности по ДНК плода, выделенной из плазмы крови матери на ранней стадии беременности, — это простой, экономичный и автоматизированный метод, который в настоящее время широко применяется в мировой практике [1—4].

В судебно-медицинской экспертизе (СМЭ) иммунологическое определение групповой принадлежности тканей и выделений человека по системам АВ0 и резус используется и как самостоятельное, и как скрининговое исследование, позволяющее отбирать образцы для проведения дорогостоящего молекулярно-генетического исследования. Однако иммунологический метод определения резус-фактора в пятнах биологических жидкостей имеет существенные ограничения, связанные не только с давностью их образования и количеством биоматериала, но и с тем, что этот белковый антиген представлен только на мембране эритроцитов. Методика выявления антигена D в следах крови характеризуется трудоемкостью, результаты не всегда воспроизводимы, а реагенты производятся нестабильно [5]. Кроме того, экспертные объекты часто загрязнены микробной флорой или имеют гнилостные изменения, а привнесенный биоматериал животных может дать неспецифическую реакцию. В такой ситуации только молекулярно-генетический метод позволяет установить резус-принадлежность любых биологических объектов, содержащих ядерную ДНК человека, в том числе костных останков, микроследов крови, слюны или других выделений, причем присутствие ДНК любого вида животных, растений и микроорганизмов не оказывает влияния на получаемый результат.

В случае микрообъектов [6] весь материал следует использовать для генетического исследования и для выявления групповой принадлежности целесообразно применять методы ДНК-анализа.

© Коллектив авторов, 2011

© Суд.-мед.эксперт., 2011

[1]e-mail: lapenkov@rc-sme.ru

[2]e-mail: zolyclone@mail.ru

[3]e-mail: jalex@syntol.ru

Резус-фенотип крови человека детерминируется комбинацией двух генов: RHD и RHCE [7], которые расположены на коротком плече хромосомы 1 (позиции 1p34.1-1p36). Гены RHD и RHCE высокогомологичны, каждый имеет размер около 75 000 н.п. и включает по 10 экзонов. Открытые рамки считывания генов RHD и RHCE имеют противоположную ориентацию: 3'-концы направлены друг к другу. RHD-ген фланкируется двумя сегментами (Rhesus boxes), каждый длиной около 9000 н.п., на 98% гомологичными и одинаково ориентированными. При наличии делеции гена RHD эти фрагменты оказываются соединенными [8].

Резус-положительный тип определяется наличием гена RHD в гомозиготном или гетерозиготном состоянии. Резус-отрицательный тип в зависимости от расовой принадлежности может быть обусловлен различными изменениями в структуре генов системы RH [9]. Для белой расы в большинстве случаев это делеция гена RHD на обеих хромосомах. Соответствующий белковый продукт — эритроцитарный антиген D — при этом не синтезируется, и проявляется резус-отрицательный фенотип.

Существуют многочисленные варианты RhD-антигена: $D^{partial}$ (D-парциальный или частичный, лишенный ряда D-эпитопов), D^{weak} (со сниженным уровнем экспрессии антигена на поверхности эритроцита), RHDφ, гибридные гены (RHD-CE-D) и т.д., частота встречаемости которых различается в зависимости от популяции [10].

Приблизительно 1—2% европейцев-доноров имеют аллельные варианты гена RHD с различными отклонениями от нормы [11, 12]. Многие разновидности антигена RhD можно идентифицировать только применяя генетический анализ, поскольку даже высокоспецифичные моноклональные антитела не позволяют различать ряд D^{weak} и $D^{partial}$.

При молекулярно-генетическом исследовании с целью выявления локуса RHD обычно проводится амплификация участков системы RH методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Детекция продуктов ПЦР проводится различными методами: по конечной точке или методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Преимущества последнего известны и изложены в работе [13].

В данной статье представлен опыт разработки и применения отечественной тест-системы определения резус-принадлежности в препарате выделенной ДНК методом ПЦР-РВ на основе технологии TaqMan.

Материал и методы

Тест-система. Набор реактивов для обнаружения фрагмента ДНК гена RHD «Резус-детект» (ЗАО «Синтол», Москва) включает в себя все компоненты, необходимые для проведения реакции (смесь дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, ПЦР-буфер, Taq ДНК-полимераза с «горячим стартом», $MgCl_2$, специфичные праймеры и зонды) и 2 образца ДНК от доноров с положительной и отрицательной реакцией на резус-фактор.

В каждой пробирке одновременно проходят три независимые реакции: амплификация участков генов RHD, RHCE и внутреннего положительного контроля. Детекция репортерной флюоресценции осуществляется по трем каналам для каждого образца. В таблице приведены характеристики и параметры определения.

Определение резус-принадлежности осуществляется путем амплификации участков 7-го экзона генов RHD и RHCE. Расщепление зондов приводит к увеличению сигналов флюоресценции красителей R6G и ROX соответственно.

Рост флюоресценции на 2-м канале свидетельствует о наличии в исследуемом препарате ДНК гена RHD, определяющего положительный резус-фактор. Рост флюоресценции на 3-м канале происходит при наличии ДНК человека в исследуемом препарате, независимо от резус-принадлежности. Данная реакция позволяет исключить ложно-резус-отрицательные результаты. Таким образом, в случае резус-положительного образца детектируется накопление сигнала флюоресценции по двум каналам, а в случае резус-отрицательного образца — только по каналу ROX.

Нами был введен дополнительный параметр определения — контроль условий ПЦР для выявления возможного ингибирования реакции. В качестве внутреннего положительного контроля (ВПК) используется оригинальная плазмида pTgt2 и специфичные к ней праймеры и зонд. Наличие ВПК позволяет исключить ложноотрицательный результат.

Контрольными образцами являются препараты выделенной из крови, очищенной фенольным методом и охарактеризованной по концентрации и чистоте спектрофотометрическим методом ДНК человека положительной и отрицательной резус-принадлежности.

Оборудование для проведения анализа. Устройство для обнаружения в режиме реального времени флюоресцентной детекцией специфической последовательности нуклеиновых кислот АНК-32 (ИАП РАН, Санкт-Петербург) [14].

Постановка ПЦР. Амплификацию проводили по программе:

95 °C — 300 с;
50 циклов: 62 °C — 50 с,
95 °C — 20 с,
25 °C — 15 с.

Исследуемые образцы:

183 образца ДНК, полученные из коллекции ФГБУ ГНЦ Минздравсоцразвития России (далее Гемцентр) от доноров крови с заведомо известным резус-фенотипом.

200 образцов крови доноров из банка Гемцентра.

Образцы различного биоматериала лиц с известной резус-принадлежностью (всего около 100 образцов от 70 лиц):

— пятна крови, высушенные на марле, срок хранения от 3 дней до 5 лет;

— буккальный эпителий и слюна, высушенные на марле, срок хранения от 3 дней до 5 лет;

— следы спермы, высушенные на марле, срок хранения 2 года и 5 лет;

— влагалищные выделения, высушенные на тампонах, срок хранения 2 года;

— следы слюны на окурках;

— луковицы волос с головы;

— частицы перхоти;

— ногти.

Образцы биоматериала животных:

— пятна слюны кошки, собаки, кролика, высушенные на марле;

— пятна крови теленка, свиньи, курицы, высушенные на марле.

Характеристики и параметры определения

Канал	Флюоресцентные метки			Амплифицируемый фрагмент	Длина фрагмента, н.п.	Контролируемый параметр
	краситель	длина волны максимума поглощения, нм	длина волны максимума флюоресценции, нм			
2-й	R6G	524	557	Участок гена RHD	134	Наличие гена RHD
3-й	ROX	580	605	Участок гена RHCE	120	Наличие гена RHCE
4-й	Cy5	646	662	Плазмида pTgt2	82	Ингибирование

Криминалистические объекты: смывы биоматериала на стерильные марлевые тампоны, микрочастицы, отобранные на биологически инертную липкую ленту, луковицы волос и пятна крови или слюны на различных носителях.

Образцы ДНК хранили при –20 °С, образцы биоматериала, высушенные на марле, — при комнатной температуре.

Препараты ДНК получали различными методами: фенольной экстракцией, с использованием ионообменной смолы Chelex 100 Resin («Bio-Rad Laboratories», США) и наборов реагентов Tissue and Hair Extraction Kit и DNA IQ™ System («Promega Corporation», США).

Серологический анализ крови.

Метод 1. Определение резус-принадлежности крови проводили с использованием тестовых карт (Diagnostic Grifols, Испания) с визуализацией результатов по антигенам систем AB0, резус (антигены D, C, c, E, e) и Kell (антиген K). Присутствие слабых вариантов антигена D (D^{weak}) оценивали по слабой агглютинации в гель-карте с анти-D моноклональным реагентом.

Метод 2. Определение проводили методом прямой агглютинации в солевой среде с использованием моноклональных антител Эритротест™-Цоликлон Анти-D Супер, Эритротест™-Цоликлон Анти-C Супер, Эритротест™-Цоликлон Анти-E Супер (ООО «Гематолог», Россия).

Результаты и обсуждение

Диагностические свойства системы проверяли на 183 образцах ДНК, полученных из коллекции Гемцентра. Из них 117 имели заведомо положительный резус-фенотип и 66 — отрицательный. Результаты определения для 180 (98,36%) образцов соответствовали заявленному фенотипу. Для одного (0,55%) образца получен ложноположительный результат, для двух (1,09%) — ложноотрицательный. Так как имелись только образцы выделенной ДНК, провести повторное серологическое исследование крови и подтвердить или опровергнуть полученные результаты не представилось возможным.

В связи с этим совместно с лабораторией физиологии кроветворения Гемцентра тест-систему испытывали дополнительно. Параллельно проводили серологическое и молекулярно-генетическое определение резус-принадлежности 200 образцов крови. Результаты, полученные обоими методами, полностью коррелировали друг с другом: обнаружено 164 резус-положительных образца, 27 резус-отрицательных. Пять образцов, которые серологически были отнесены к слабоположительным (D^{weak}), методом ПЦР-РВ определялись как положительные. В 9 случаях ПЦР ингибировалась полностью, что может быть связано с присутствием антикоагулирующих агентов.

Чувствительность тест-системы определяли в серии разведений препаратов ДНК, полученных из образцов крови и слюны 15 лиц с известной резус-принадлежностью. Установлено, что критической для определения резуса данным методом является концентрация ядерной ДНК 0,1 нг/мкл; при вводимом объеме, равном 5 мкл, количество ДНК должно составлять соответственно не менее 0,5 нг. По результатам измерений чувствительность определения разработанной тест-системы признана удовлетворительной, так как находится в пределах, обычных для молекулярно-генетических исследований, например при генотипировании.

Способность тест-системы различать редко встречающиеся варианты $D^{partial}$, D^{weak}, RHDφ и гибридные гены не исследовали в связи с отсутствием таких образцов. По всей вероятности, типы, в которых отсутствует 7-й экзон гена RHD (гибридные гены), будут определены как резус-отрицательные, а варианты $D^{partial}$, D^{weak}, RHDφ, имеющие нормальную последовательность в 7-м экзоне, — как резус-положительные.

Специфичность тест-системы испытывали на препаратах ДНК кролика, кошки, теленка, свиньи, собаки, курицы. Роста флюоресценции по каналам R6G и ROX не наблюдалось, ингибирование ПЦР отсутствовало. Таким образом, было показано, что данная система является специфичной к ДНК человека.

Для выяснения возможности применения данного метода в криминалистической практике проводили анализ образцов, аналогичных наиболее распространенным в СМЭ. Образцы ДНК предварительно оценивали количественно и качественно: содержание ДНК составляло от 0,05 до 8 нг/мкл, ингибирование ПЦР отсутствовало. Резус-принадлежность крови лиц, от которых были получены пробы биоматериала, определяли молекулярно-генетическим методом. Результаты молекулярно-генетического и серологического исследований полностью совпадали. Способ выделения ДНК не оказывал влияния на результат. Резус-отрицательные образцы составили 13% всех исследованных.

После апробации метода было начато тестирование препаратов ДНК, полученных из криминалистических объектов. Содержание ДНК в препаратах составляло от 0,1 до 1,5 нг/мкл. Всего проанализировано около 350 образцов.

Предлагаемый метод относится к разряду качественных, т.е. позволяет установить факт присутствия или отсутствия объекта контроля при определенном пороговом значении его содержания. Определение резус-при-

надлежности следует проводить после количественной оценки препарата ДНК. В области криминалистики разработанная тест-система может применяться при исследовании микрообъектов, для дифференциации объектов, а также для получения оперативно-розыскной информации.

Работа была выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования ВНИИСБ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Avent N.D.* RHD genotyping from maternal plasma: guidelines and technical challenges: a review. Methods Mol Biol 2008; 444: 185—201.
2. *Müller S.P., Bartels I., Stein W. et al.* The determination of the fetal D status from maternal plasma for decision making on RH prophylaxis is feasible. Transfusion 2008; 48: 2292—2301.
3. *Daniels G., Finning K., Martin P., Summers J.* Fetal blood group genotyping: present and future. Ann N Y Acad Sci 2006; 1075: 88—95.
4. *Xbong X.Y., Holzgreve W., Habn S.* Risk free simultaneous prenatal identification of fetal rhesus D status and sex by multiplex real-time PCR using cell free fetal DNA in maternal plasma. Swiss Med Wkly 2001; 131: 70.
5. *Кондратова И.В., Гусаров А.А.* О новой технологии выявления антигена D системы RH в следах крови реакцией абсорбции-элюции с применением высокоактивных протеаз. Суд-мед эксперт 2010; 6: 24—26.
6. *Лапенков М.И., Александрова В.Ю., Законова А.Ф.* Комплексный подход к исследованию микроследов человека. Суд-мед эксперт 2009; 2: 18—21.
7. *Colin Y., Cherif-Zahar B., Le Van Kim C. et al.* Genetic basis of the RHD-positive and RHD-negative blood group polymorphism as determined by southern analysis. Blood 1991; 78: 2747—2752.
8. *Wagner F.F., Flegel W.A.* RHD gene deletion occurred in the rhesus box. Blood 2000; 95: 3662—3668.
9. *Flegel A.F.* The genetics of the rhesus blood group system. A review. Blood Transfusion 2007; 5: 50—57.
10. *Singleton B.K., Green C.A., Avent N.D. et al.* The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in africans with the RHD-negative blood group phenotype. Blood 2000; 95: 1: 12—18.
11. *Wagner F.F., Gassner C., Muller T.H. et al.* Molecular basic of weak D phenotypes. Blood 1999; 93: 385—393.
12. *Chen Q., Willy A.F.* Random survey for RHD alleles among D+ europian persons. Immunohematol Transfus 2005; 45: 1183—1191.
13. *Лапенков М.И., Плахина Н.В., Алексеев Я.И., Варламов Д.А.* Разработка тест-системы для количественной и качественной оценки содержания ДНК в криминалистических образцах методом ПЦР-РВ. Суд-мед эксперт 2011; 2: 34—38.
14. *Алексеев Я.И., Белов Ю.В., Варламов Д.А. и др.* Приборы для диагностики биологических объектов на основе метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Научное приборостроение 2006; 16: 3: 132—136.