

doi: 10.17116/repro201622539-43

Генетические и молекулярно-клеточные технологии в диагностике резус-фактора плода у беременных с резус-отрицательной кровью

Д.М.Н., проф., зав. каф. Е.Н. КРАВЧЕНКО, асс. М.А. ОЖЕРЕЛЬЕВА

ГБОУ ВПО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, Омск, Россия, 644043

Цель исследования — выявить аналитические возможности методики неинвазивного определения резус-фактора плода по крови беременной женщины с использованием наборов реагентов Тест-RHD плюс (производство ООО «ТестГен», Россия), АмплиПрайм ДНК-сорб-Б (производство ООО «НекстБио», Россия), Rotor-Gene6000 (производство «Corbett Research», Австралия) и проанализировать современные данные аналитических возможностей методик тестирования объема фетоматеринского кровотечения.

Материал и методы. Обследованы 46 беременных с резус-отрицательной кровью. На основе полученных данных рассчитаны аналитические возможности методики.

Результаты. Диагностическая точность — 97,82%, чувствительность — 100%, специфичность — 92,85%, прогностическая ценность положительного результата — 96,96%, прогностическая ценность отрицательного результата — 100%. Методика проточной цитометрии имеет высокие аналитические характеристики и является современным методом тестирования объема фетоматеринского кровотечения.

Выводы. При четком соблюдении условий проведения исследования методика неинвазивного определения резус-фактора плода по крови беременной женщины с использованием вышеупомянутого набора реагентов может быть рекомендована к применению в рутинной лабораторной практике.

Ключевые слова: неинвазивная диагностика резус-фактора плода, внеклеточная фетальная ДНК, ТестГен.

Genetic and molecular cell technologies in diagnostics Rh Factor fetus in pregnant women with Rh-negative blood

E.N. KRAVCHENKO, M.A. OZHERELEVA

State budgetary educational institution of higher professional education «Omsk state medical University» of the Ministry of health of the Russian Federation, Omsk, Russia, 644043

Objective. To define the analytical capabilities of non-invasive determination of fetal Rhesus blood of pregnant woman and to analyze current data of analytical testing of feto-maternal hemorrhage volume.

Material and methods. The study included 46 pregnant Rh-negative women.

Results. Diagnostic accuracy of method was 97.82%, sensitivity — 100%, specificity — 92.85%, positive predictive value — 96.96%, negative predictive value — 100%. The technique of flow cytometry has a high analytical performance.

Conclusion. The technique of non-invasive determination of fetal Rhesus blood of pregnant woman may be recommended for the use in routine laboratory practice.

Keywords: non-invasive diagnostics Rh factor of fetal, extracellular fetal DNA TestGen.

Резус-иммунизация во время беременности — появление у беременной резус-антител в ответ на попадание в кровоток фетальных эритроцитов, имеет большое значение для перинатальных исходов ввиду развития гемолитической болезни плода и новорожденного. В прошлом столетии понятие гемолитической болезни плода и новорожденного было почти синонимом резус-иммунизации. В настоящее время основным неинвазивным методом диагностики гемолитической болезни плода является ультразвуковое исследование с доплерометрией пиковой си-

столической скорости кровотока в средней мозговой артерии плода. К инвазивным методам диагностики гемолитической болезни плода относятся: амниоцентез (оценка оптической плотности билирубина в околоплодных водах) и кордоцентез с последующим лабораторным исследованием крови плода. Исследование плодовой крови, полученной путем кордоцентеза, позволяет оценить тяжесть заболевания, определить показания к проведению внутриутробной гемотрансфузии. В то же время с внедрением в клиническую практику оценки пиковой систоличе-

ской скорости кровотока как критерия анемического синдрома у плода инвазивные методики несколько утратили свое значение.

В последнее время с целью снижения частоты акушерских и перинатальных осложнений интенсивно разрабатываются неинвазивные методы дородовой диагностики различной наследственной патологии. Чаще всего неинвазивные методы, не требующие забора плодного материала, применяют для диагностики у плода врожденных пороков развития и хромосомных синдромов. В то же время сфера неинвазивной пренатальной диагностики не ограничивается диагностикой генетических особенностей и анеуплоидий плода. Одно из активно развивающихся направлений — неинвазивное генетическое определение резус-фактора плода у женщин с резус-отрицательной принадлежностью крови [1—4]. До настоящего времени преобладает результативность исследований неинвазивной пренатальной диагностики и клинической практики была довольно ограничена. Успехи в улучшении аналитических характеристик тест-систем, стандартизация протоколов выделения внеклеточной фетальной ДНК и последующей ПЦР (полимеразная цепная реакция)-амплификации, использование современных ПЦР-амплификаторов повысили показатели диагностической точности, чувствительности и специфичности методик и активно способствуют внедрению последних в рутинную клиничко-лабораторную практику [5].

Цель исследования — выяснить аналитические возможности (чувствительность, специфичность, прогностическая ценность положительного и отрицательного результата, диагностическая точность) методики неинвазивного определения резус-фактора плода по крови беременной женщины с использованием тест-систем Тест-RHD плюс (производство ООО «ТестГен», Россия), АмплиПрайм ДНК-сорб-Б (производство ООО «НекстБио», Россия), Rotor-Gene6000 (производство «Corbett Research», Австралия); проанализировать современные данные аналитических возможностей методик тестирования объема фетоматеринского кровотока (ФМН).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включены результаты обследования 46 беременных с резус-отрицательной принадлежностью крови, наблюдавшихся и родоразрешенных в бюджетном учреждении здравоохранения Омской области «Городской клинический перинатальный центр» (главный врач С.В. Николаев), Омск. Критерии включения в исследование: резус-отрицательная принадлежность крови беременной; факт беременности, подтвержденный объективными методами; срок гестации более 10 нед, наличие информированного добровольного согласия.

Для выделения внеклеточной циркулирующей фетальной ДНК из клинического материала применяли комплект реагентов АмплиПрайм ДНК-сорб-Б (производство ООО «НекстБио», Россия). В результате экстракции получался высокоочищенный препарат ДНК, свободный от ингибиторов реакции амплификации, обеспечивающий высокую аналитическую чувствительность ПЦР-исследования. Для определения резус-фактора плода методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией использовался набор реагентов Тест-RHD плюс (производство ООО «ТестГен», Россия), Амплификатор Rotor-Gene6000 (производство «Corbett Research», Австралия).

Для получения плазмы кровь (не менее 8 мл) отбиралась в пробирку с EDTA-антикоагулянтом, последующее отделение плазмы проводилось в течение 3 ч с момента взятия крови. Программа амплификации представлена в **таблице**.

Все реакции сопровождалась постановкой отрицательного и положительного контроля (набор Тест-RHD). Результат ПЦР-исследования считался достоверным при получении совпадения данных для отрицательных и положительных контролей амплификации. Полученные результаты подтверждались серологическим методом исследования крови новорожденного после родоразрешения обследуемой.

Проанализированы аналитические характеристики методики: диагностическая точность, чувствительность, специфичность, положительная прогностическая ценность, отрицательная прогностическая ценность.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам ДНК-анализа 46 образцов крови положительный резус-фактор был выявлен в 71,7% (33 образца) наблюдений, резус-фактор плода был отрицательным в 28,3% (13 образцов). Данные результаты подтверждены серологическим методом исследования резус-фактора у новорожденных. В одном случае отмечено несовпадение результата анализа: при положительном результате по данным тест-системы у новорожденного оказалась резус-отрицательная кровь. При этом не представлялось возможным уточнить генетический статус плода, проанализировав буккальный соскоб, ввиду отказа пациентки от исследования. При анализе возможных причин расхождения полученных результатов в вышеуказанном случае установлены нарушения правил

Программа амплификации

Стадия	Температура, °С	Время	Всего циклов
1	95	5 мин	1
2	94	10 с	60
3	62	50 с	

транспортировки и хранения материала. Таким образом, данный результат не может учитываться при анализе аналитических возможностей данного метода диагностики.

Проанализированы аналитические характеристики методики. Получены: диагностическая точность — 97,82%, чувствительность — 100%, специфичность — 92,85%, прогностическая ценность положительного результата — 96,96%, прогностическая ценность отрицательного результата — 100%.

В Российской Федерации активно внедряется принятая в европейских странах методика Rh(D)-генотипирования плода [6—10]. Чувствительность данного метода при сроке гестации 10—11 нед, по данным F. Clausen [7], составляет 99,3%, по другим сообщениям [12] — 98,7%, специфичность — 100%. Также разработаны ДНК-зонды к другим антигенам эритроцитов: С, Е, К, FyA, JkA, JkB, М, S (Соединенное Королевство Великобритании) [13].

Учеными отмечена экономическая эффективность внедрения RHD-генотипирования плода в программу наблюдения и ведения беременных [14]. В Дании определение резус-принадлежности плода по крови матери входит в стандарты наблюдения и ведения беременных. Данный рутинный дородовой скрининг позволяет отобрать беременных, нуждающихся в проведении плановой профилактики резус-иммунизации в срок 28—30 нед [15]. Референсная лаборатория в Бристоле выполняет данные исследования с 2001 г., и в настоящее время выполняет около 200 исследований в год у женщин в сроки беременности 26—32 нед, при этом дискордантные результаты отсутствуют с 2005 г.

В мировой клинической практике разработано несколько экономических моделей, позволяющих судить об экономической целесообразности применения вариантов данных моделей для предотвращения резус-иммунизации. Учитывая стоимость проведения исследования, был сделан вывод о том, что проведение плановой иммунопрофилактики остается предпочтительным методом профилактики резус-иммунизации [16]; данная позиция также разделяется Итальянским обществом акушеров-гинекологов (SIGO) [17]. Кроме того, обсуждается возможность внедрения в повседневную практику RHC/c, RHE/e, KEL генотипирования плода [6]. В Норвегии действует программа скрининга, включающая типирование не только резус-принадлежности плода по крови матери, но и определение тромбоцитарных аллелей HPA-1A, с целью идентификации HPA-1b1b и последующего проведения профилактических мероприятий [18].

В Швеции в 2012 г. при внедрении методики в клиническую практику получены следующие результаты: инвазивное определение резус-фактора плода выполнено у 4118 беременных женщин, медиана срока беременности составила 10 нед. Повтор-

ный анализ пришлось выполнить в 211 (5,1%) случаях. Выявлен положительный резус-фактор плода в 2401 (58,3%) случае, отрицательный в 1552 (37,7%), результаты были неубедительны в 165 (4,0%) случаях после первого тестирования. После повтора анализа 147 из 165 образцов только у 14 образцов получены неубедительные результаты, во всех случаях по причине слабого или неэкспрессирующегося материнского RHD гена. В качестве «золотого стандарта» для подтверждения резус-фактора новорожденных применялось серологическое определение. Количество ложноотрицательных результатов составило 55 (2,4%) из 2297, ложноположительных — 15 (1,1%) из 1355; чувствительность и специфичность оказались близкими к 99% в образцах после 8-й недели беременности, в срок 22 нед беременности чувствительность составила 100% [19].

В России многоцентровое исследование неинвазивного определения резус-фактора выполнялось на базе 11 учреждений (анализ показателей информативности наборов реагентов Тест-SRY и Тест-RHD при установлении пола и резус-фактора плода). Представлены результаты обширных доклинических испытаний наборов реагентов Тест-SRY и Тест-RHD производства компании «ТестГен» для раннего неинвазивного определения пола и резус-фактора плода по крови беременной женщины. Проведен анализ данных, полученных в ходе мультицентрового исследования на базе 11 лабораторий. В исследовании приняли участие 1817 беременных женщин, у 1006 проведен анализ по полу плода и у 811 — по резус-фактору плода (все женщины, участвовавшие в анализе резус-фактора плода, сами имели отрицательный резус-фактор). Установлено, что методики определения пола и резус-фактора плода по крови беременной женщины с применением наборов Тест-SRY и Тест-RHD обладают высокими показателями диагностической точности, чувствительности и специфичности [20].

Современная стратегия ведения беременных с резус-отрицательной принадлежностью крови в призмe современных достижений науки включает не только определение резус-фактора плода по крови беременной женщины, но и тестирование объемов FMH с целью подбора корректной дозы анти-Rh(D) иммуноглобулина G. В настоящее время методом контроля плодово-материнских трансфузий являются проточная цитометрия (FCM), кислотно-связывающий тест Kleinhauer-Betke (КВТ). Эти методы применялись для определения объема FMH с целью выбора адекватного объема иммунопрофилактики. По полученным данным, в 92,5 и 87% случаев соответственно регистрировался объем FMH менее 10 мл крови, что потенциально может быть нейтрализовано меньшим объемом анти-Rh(D) иммуноглобулина G. Объем FMH был более 30 мл в 1,3 и 2,7% случаев, рассчитан по КВТ и FCM соответ-

ственно. Данная категория женщин нуждалась в дополнительной дозе анти-Rh(D) иммуноглобулина G.

Согласно полученным данным, метод FCM набора FMH QuikQuant с использованием антитела анти-HbF обладал чувствительностью 89,8% и специфичностью 93,2%; значение метода в определении объема FMH отмечено и другими учеными. Данная методика основана на идентификации D-положительных эритроцитов в присутствии D-отрицательных эритроцитов. В прямом тесте используется меченный флюорохромом анти-D, а в непрямой версии этого теста используется меченный флюорохромом анти-IgG. Кроме того, разработаны и опробованы методики, позволяющие минимизировать лейкоцитарный эффект при проведении анализа, с помощью специальных реагентов (FITC анти-D, AEVZ5.3-FITC, FITC, BRAD-3-FITC/anti-CD45, BRAD-3-FITC/anti-CD66b-PE). По данным мониторингового исследования, проведенного в Италии, в 70% случаев оценка объема FMH не происходит, в Российской Федерации подобная методика реализуется в основном в научно-исследовательских работах.

Проспективное исследование, проводимое в Чехии с участием 3457 родильниц, показало, что кесарево сечение не является существенным фактором риска высокого FMH, требующего введения дополнительной дозы анти-Rh(D) иммуноглобулина G, и в большинстве случаев объем FMH составляет менее 5 мл, что вполне компенсируется 100 мкг анти-Rh(D) иммуноглобулина G. Для оценки персис-

тенции фетального гемоглобина (HbF) Международный комитет по стандартизации в гематологии предлагает использовать метод автоматизированной жидкостной хроматографии высокой производительности и капиллярный электрофорез. Оценка FMH не рекомендуется в случае потенциально сенсibilизирующего события, возникшего до 20 нед беременности.

ВЫВОДЫ

Методика определения резус-фактора плода по крови женщины на ранних сроках беременности с использованием одноэзонного метода обладает высокими показателями диагностической точности, чувствительности и специфичности; является простой и надежной в исполнении и может быть рекомендована для применения в рутинной клинической практике. Для правильного определения резус-фактора плода по крови беременной женщины необходимо соблюдение следующих условий: проведение исследования в срок беременности с 10-й недели; правильное обращение с плазмой и ее транспортировка; выделение ДНК в максимально быстрые сроки; выделение ДНК с использованием надежной технологии; организация работы в ПЦР-лаборатории, согласно действующим национальным нормам; четкое следование инструкции [21].

Конфликт интересов отсутствует.

ЛИТЕРАТУРА

- Klein H, Anstee D. Hemolytic disease of the fetus and newborn. *Blood Transfusion in Clinical Medicine*. 2005;5:496-545. doi: 10.1002/9780470986868.ch12
- Kent J, Farrell M, Soothill P. Routine administration of Anti-D: the ethical case for offering pregnant women fetal RHD genotyping and a review of policy and practice. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2014;14:87. doi: 10.1186/1471-2393-14-87
- Schmidt LC, Cabral AC, Faria MA, Monken F, Tarazona-Santos E, Martins ML. Noninvasive fetal RHD genotyping from maternal plasma in an admixed Brazilian population. *Genet Mol Res*. 2014;7:13:799-805. doi: 10.4238/2014.February.7.1
- Guinchard E, Bricca P, Monnier S, Rigal D. Non-invasive fetal RHD genotyping: Validation of the method with 200 patients. *Transfus Clin Biol*. 2014;21:1:1-14. doi: 10.1016/j.tracli.2013.12.001
- Ожерельева М.А., Кравченко Е.Н., Куклина Л.В. Резус-сенсibilизация, гемолитическая болезнь плода и новорожденного. Современные тенденции и перспективы. *Акушерство и гинекология*. 2015;12:16-20.
- Ожерельева М.А., Кравченко Е.Н., Куклина Л.В. Профилактика резус-иммунизации при потенциально сенсibilизирующем событии. *Акушерство и гинекология*. 2015;11:117-120.
- Clausen FB, Damkjær MB, Dziegiel MH. Noninvasive fetal RhD genotyping. *Transfus Apher Sci*. 2014;50:2:154-162. doi: 10.1016/j.transci.2014.02.008
- Sapa A, Jonkisz A, Zimmer M, Kłósek A, Woźniak M. Diagnostic utility of RHD-gene detection in maternal plasma in the prophylaxis of fetomaternal Rh-incompatibility. *Ginekol Pol*. 2014;85:8:570-576.
- Tsui NB, Hyland CA, Gardener GJ, Danon D, Fisk NM, Millard G, Flower RL, Lo YM. Noninvasive fetal RHD genotyping by microfluidics digital PCR using maternal plasma from two alloimmunized women with the variant RHD(IVS3+1G>A) allele. *Prenat Diagn*. 2013;33:12:1214. doi: 10.1002/pd.4230
- Manzanares S, Entrala C, Sánchez-Gila M, Fernández-Rosado F, Cobo D, Martínez E, Molina L, Reche R, Pineda A, Gallo JL. Noninvasive fetal RhD status determination in early pregnancy. *Fetal Diagn Ther*. 2014;35:1:7-12. doi: 10.1159/000356078
- Manzanares S, Entrala C, Sánchez-Gila M, Fernández-Rosado F, Cobo D, Martínez E, Molina L, Reche R, Pineda A, Gallo JL. Noninvasive fetal RhD status determination in early pregnancy. *Fetal Diagn Ther*. 2014;35:1:7-12. doi: 10.1159/000356078

12. Geifman-Holtzman O, Grotegut CA, Gaughan JP. Diagnostic accuracy of noninvasive fetal Rh genotyping from maternal blood — a metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;195:4:1163-1173.
13. Finning K, Martin P, Summers J, Daniels G. Fetal genotyping for the K (Kell) and Rh C, c, and E blood groups on cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Transfusion.* 2007;47:11:2126-2133.
14. Gönenç G, Işçi H, Yiğiter AB, Hançer V, Büyükdöğün M, Güdücü N, Dündar I. Non-invasive prenatal diagnosis of fetal RhD by using free fetal DNA. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2015;42:3:344-360.
15. Guinchard E, Bricca P, Monnier S, Rigal D. Non-invasive fetal RHD genotyping: Validation of the method with 200 patients. *Transfus Clin Biol.* 2014;21:1:1-14.
doi: 10.1016/j.tracli.2013.12.001
16. Duplantie J, Martinez Gonzales O, Bois A, Nshimyumukiza L, Gekas J, Bujold E, Morin V, Vallée M, Giguère Y, Gagné C, Rousseau F, Reinharz D. Cost-effectiveness of the management of rh-negative pregnant women. *J Obstet Gynaecol.* 2013;35:8:730-740.
17. Bennardello F, Curciarello G. Survey on the prevention and incidence of haemolytic disease of the newborn in Italy. *Blood Transfus.* 2013;12:11:518-527.
doi: 10.2450/2013.0179-12
18. Avent ND. Prenatal testing for hemolytic disease of the newborn and fetal neonatal alloimmune thrombocytopenia — current status. *Rev Hematol.* 2014;7:6:741-750.
doi: 10.1586/17474086.2014.970160
19. Wikman AT, Tiblad E, Karlsson A, Olsson ML, Westgren M, Reilly M. Noninvasive Single-Exon Fetal RHD Determination in a Routine Screening Program in Early Pregnancy. *Obstetrics and Gynaecol.* 2012;120:2:227-234.
doi: 10.1097/AOG.0b013e31825d33d9
20. Тороповский А.Н., Никитин А.Г., Жмырко Е.В., Скороходов Л.С., Беляков А.В., Викторов Д.А. Анализ показателей информативности наборов реагентов ТЕСТ-SRY и ТЕСТ-RHD при определении резус-фактора плода. *Фундаментальные исследования.* 2014;10:1566-1571.
21. Маркелова А.Н., Тюмина А.В., Тороповский А.Н. Новый подход к ведению беременных женщин с резус-отрицательной кровью с ранних сроков беременности. *Фундаментальные исследования.* 2011;11:2:330-332.