

# Возможности неинвазивного резус-генотипирования плода для использования в амбулаторной практике

С.М.Махмудова<sup>1,2</sup>, С.В.Павлович<sup>✉1</sup>, Д.Ю.Трофимов<sup>1</sup>, А.Е.Донников<sup>1</sup>, Л.З.Файзуллин<sup>1</sup>, А.А.Дьяконова<sup>1</sup>, В.Н.Карнаухов<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>ФГБУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова Минздрава России. 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4;  
<sup>2</sup>ГБУЗ Городская поликлиника №195 Департамента здравоохранения г. Москвы. 121614, Россия, Москва, ул. Крылатские холмы, д. 51

Цель исследования – оптимизация подходов к курации беременных с резус-отрицательным типом крови при использовании неинвазивного метода определения резус-генотипирования плода по крови матери. В результате проведенного исследования в группе из 204 беременных с резус-отрицательным типом крови в сроках 14–27 нед с применением неинвазивного метода резус-генотипирования было показано, что чувствительность метода неинвазивного определения резус-принадлежности плода составляет 99,0%. Определение резус-принадлежности плода позволяет персонализировать проведение иммунопрофилактики у беременных с резус-отрицательным типом крови.

**Ключевые слова:** гемолитическая болезнь плода, беременность при резус-отрицательном типе крови, неинвазивное резус-генотипирование плода, свободная эмбриональная ДНК.

✉st.pavlovich@mail.ru

**Для цитирования:** Махмудова С.М., Павлович С.В., Трофимов Д.Ю. и др. Возможности неинвазивного резус-генотипирования плода для использования в амбулаторной практике. Гинекология. 2016; 18 (2): 25–26.

## Non-invasive fetal RHD determination in out-patient practice

S.M.Makhmudova<sup>1,2</sup>, S.V.Pavlovich<sup>✉1</sup>, D.Iu.Trofimov<sup>1</sup>, A.E.Donnikov<sup>1</sup>, L.Z.Faizulin<sup>1</sup>, A.A.D'iakonova<sup>1</sup>, V.N.Karnaukhov<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>V.I.Kulakov Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of the Ministry of Health of the Russian Federation. 117997, Russian Federation, Moscow, ul. Akademika Oparina, d. 4;  
<sup>2</sup>City clinical hospital №195 of the Department of Health of Moscow. 121614, Russian Federation, Moscow, ul. Krylatskie kholmy, d. 51

The aim of the study was to improve approaches to the use of Rh0(D) immune globulin in pregnant women with Rh-negative blood by introducing noninvasive method of determination of fetal rhesus blood factor by mother's blood into curative program of pregnancy at risk of RBC sensitization. The accuracy of noninvasive method of rhesus genotyping in 204 pregnant women with Rh negative blood in 14–27 weeks of pregnancy was 99.0%. The determination of fetal rhesus allows personify implementation of immunological prophylaxis in Rh negative pregnant women.

**Key words:** haemolytic disease of the fetus, pregnancy with Rh negative blood type, Rh noninvasive fetal genotyping, cell-free DNA.

✉st.pavlovich@mail.ru

**For citation:** Makhmudova S.M., Pavlovich S.V., Trofimov D.Iu. et al. Non-invasive fetal RHD determination in out-patient practice. Gynecology. 2016; 18 (2): 25–26.

Одним из приоритетных направлений современного акушерства является персонализация подходов к ведению гестационного процесса, включающая выявление риска развития и проведение своевременной профилактики осложнений, а также, при необходимости, выбор оптимальной для каждого пациента лечебной тактики.

Несовместимость по резус-фактору между резус-отрицательной матерью, вынашивающей резус-положительный плод, остается основной причиной возникновения гемолитической болезни плода и новорожденного [1–3].

Концепция запланированного введения антирезусного иммуноглобулина на антенатальном этапе и после родоразрешения способствовала существенному снижению резус-сенсibilизации [4–6]. В то же время в европейской популяции частота рождения резус-отрицательных новорожденных при резус-отрицательном типе крови у матери достигает 41%, и, соответственно, при своевременной и качественной диагностике резус-принадлежности плода можно было бы избежать нерациональной иммунопрофилактики [7, 8].

Оценка резус-принадлежности плода в настоящее время возможна с применением как инвазивных, так и неинвазивных подходов. В течение последних 30 лет проводится поиск неинвазивных методов в диагностике состояний плода, что позволило снизить риск возникновения осложнений от инвазивных процедур и затраты на ведение беременности [9]. После открытия Y.Lo и соавт. в 1997 г. свободно циркулирующей эмбриональной ДНК в кровотоке матери начались исследования по возможности предикции осложнений гестационного процесса, с одной стороны, и неинвазивной пренатальной диагностики – с другой. Одной из задач неинвазивной пренатальной диагно-

стики, основанной на применении молекулярно-генетических методов исследования, является определение резус-принадлежности плода [10].

**Целью данного исследования** явилась оптимизация подходов к ведению беременных с резус-отрицательным типом крови при применении неинвазивного метода определения резус-фактора плода.

### Материалы и методы

Нами были обследованы 204 резус-отрицательных женщин при резус-положительном супруге. Принадлежность к резус-фактору определяли стандартными серологическими методами. Критериями включения пациенток в исследование являлись наличие резус-отрицательной группы крови без признаков сенсibilизации, вынашивание беременности от резус-положительного супруга; гестационный возраст 14–27 нед, считая от 1-го дня менструации. В исследование не включались пациентки при наличии резус-сенсibilизации. Беременные находились на амбулаторном наблюдении в научно-поликлиническом отделении ФГБУ «НЦАГиП им. акад. В.И.Кулакова» или в женской консультационной при ГБУЗ ГП №195. Проведение исследования было одобрено этическим комитетом ФГБУ «НЦАГиП им. акад. В.И.Кулакова». Все пациентки предоставляли информированное согласие на проведение неинвазивного резус-генотипирования плода. Обследование и ведение беременных проводилось в соответствии с Порядком оказания акушерско-гинекологической помощи.

Забор крови для определения резус-принадлежности плода осуществлялся из кубитальной вены в сроки 14–27 нед беременности. Определение проводилось в лаборатории молекулярно-генетических методов ФГБУ «НЦАГиП им. акад. В.И.Кулакова».

Для молекулярно-генетических исследований у беременных использовали периферическую кровь, собранную в пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой в качестве антикоагулянта. Плазму получали методом двойного центрифугирования: вначале проводили осаждение форменных элементов при 3000 g в течение 10 мин, далее полученную плазму отбирали и повторно центрифугировали при 13 000 g в течение 5 мин. ДНК получали из 500 мкл плазмы с использованием реагентов для выделения ДНК «Проба-ГС» (ООО «ДНК-Технология», Россия).

Выявление гена RHD проводилось методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием набора реагентов для выявления ДНК плода в крови матери методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «Пренатальная диагностика. Резус-фактор» (ООО «ДНК-Технология», Россия).

Реакцию амплификации и оценку результатов делали на программируемом амплификаторе «ДТ-96» (ООО «ДНК-Технология», Россия) согласно инструкции.

Резус-принадлежность новорожденных определялась в родовспомогательных учреждениях иммунологическими методами непосредственно после родов.

### Результаты и обсуждение

Средний возраст беременных в группе составлял 30,2±4,7 года. Первородящие составили 47,5%, повторнородящие – 52,5%. Все беременные были обследованы согласно медицинским стандартам, при отсутствии резус-антител проведено неинвазивное резус-генотипирование плода в сроке от 14 до 27 нед беременности. Результаты исследования показали, что в 151 (74,0%) случае был выявлен RHD-ген.

Всем новорожденным после рождения была определена группа и резус-принадлежность крови, резус-положительными были 151 (74,0%) и резус-отрицательными – 53 (26,0%) новорожденных. Несовпадение результатов антенатального и постнатального определения резус-принадлежности имело место в 2 случаях – в одном из них резус-положительный плод был определен как резус-отрицательный и в другом – резус-отрицательный – как резус-положительный.

Таким образом, чувствительность составила 99,30 (96,4–100)%, специфичность – 98,10 (89,9–100)%. Точность метода неинвазивного резус-генотипирования – 99,0%.

Согласно данным разных авторов проведение неинвазивного резус-генотипирования обладает достаточно высоким уровнем чувствительности, достигающим 94,8–100% [9–12].

Результаты нашего исследования позволяют сделать вывод о целесообразности и эффективности определения ре-

зус-принадлежности плода с помощью определения свободной эмбриональной ДНК во II триместре беременности, что, соответственно, позволит персонифицировать подходы к ведению беременности, ограничить необходимость многократного определения антител у части резус-отрицательных беременных, избирательно проводить антенатальное профилактическое введение антирезусного иммуноглобулина, а в ряде ситуаций избежать проведения инвазивных вмешательств в период беременности.

### Литература/References

1. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. *Blood Transfusion in Clinical Medicine*, 10th ed. Oxford, Blackwell Science Ltd, 1997.
2. Lo YM, Hjelm NM, Fidler C et al. Prenatal diagnosis of fetal RbD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med* 1998; 339: 1734–8.
3. Clausen FB, Krog GR, Rieneck K et al. Reliable test for prenatal prediction of fetal RbD type using maternal plasma from RbD negative women. *Prenat Diagn* 2005; 25: 1040–4.
4. Engelfriet CP, Reesink HW, Judd WJ et al. Current status of immunoprophylaxis with anti-D immunoglobulin. *Vox Sang* 2003; 85: 328–37.
5. Flegel WA, Wagner FF. Molecular genetics of RH. *Vox Sang* 2000; 78 (Suppl. 2): 109–15.
6. Mackenzie LZ, Roseman F, Findlay J et al. The kinetics of routine antenatal prophylactic intramuscular injections of polyclonal anti-D immunoglobulin. *BJOG* 2006; 113: 97–101.
7. Daniels G. *Human Blood Groups*, 2nd ed. Oxford, Blackwell Science Ltd, 2002.
8. Van der Schoot CE, Soussan AA, Koelewijn J et al. Noninvasive antenatal RHD typing. *Transfus Clin Biol* 2006; 13: 53–7.
9. Темруаивили НК, Федорова НИ, Файзуллин ЛЗ, Карнаухова ВН. Определение свободной эмбриональной ДНК в плазме крови беременных для неинвазивной пренатальной генетической диагностики. *Акуш. и гинекол.* 2012; 6: 4–8. / Tetruashvili NK, Fedorova NI, Faizullin LZ, Karnaukhova VN. Opredelenie svobodnoi embriional'noi DNK v plazme krovi beremennykh dlia neinvazivnoi prenatal'noi geneticheskoi diagnostiki. *Akush. i ginekol.* 2012; 6: 4–8. [in Russian]
10. Finning KM, Martin PG, Sootbill PW, Avent ND. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfus* 2002; 42 (8): 1079–85.
11. Rouillac-Le Sciellour C, Puillandre P, Gillot R et al. Large-scale pre-diagnosis study of fetal RHD genotyping by PCR on plasma DNA from RbD-negative pregnant women. *Mol Diagn* 2004; 8 (1): 23–31.
12. Minon JM, Gerard C, Senterre JM et al. Routine fetal RHD genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium. *Transfus* 2008; 48 (2): 373–81.
13. Hromadnikova I, Vecbetova L, Vesela K et al. Non-invasive fetal RHD exon 7 and exon 10 genotyping using real-time PCR testing of fetal DNA in maternal plasma. *Fetal Diagn Ther* 2005; 20 (4): 275–80.

### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Махмудова Саида Магомедовна – врач акушер-гинеколог ГБУЗ ГП №195, НЦАГиП им. акад. В.И.Кулакова

Павлович Станислав Владиславович – ученый секретарь ФГБУ НЦАГиП им. акад. В.И.Кулакова. E-mail: st.pavlovich@mail.ru

Трофимов Дмитрий Юрьевич – зав. лаб. молекулярно-генетических методов ФГБУ НЦАГиП им. акад. В.И.Кулакова

Донников Андрей Евгеньевич – ст. науч. сотр. лаб. молекулярно-генетических методов ФГБУ НЦАГиП им. акад. В.И.Кулакова

Файзуллин Леонид Закиевич – вед. науч. сотр. лаб. молекулярно-генетических методов ФГБУ НЦАГиП им. акад. В.И.Кулакова

Дьяконова Анна Александровна – ст. науч. сотр. 2-го отд-ния акушерского патологического центра беременности ФГБУ НЦАГиП им. акад. В.И.Кулакова

Карнаухов Виталий Николаевич – мл. науч. сотр. лаб. молекулярно-генетических методов ФГБУ НЦАГиП им. акад. В.И.Кулакова